

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

MICROFIBRAS DE PLA/PROTAMINA CARGADAS CON BACTERIÓFAGOS



Memoria

| | |
|----------------------|---------------------|
| Autor: | Xavier Mateo Millán |
| Director: | Luis J. del Valle |
| Co-Director: | Núria Saperas |
| Convocatoria: | Octubre 2017 |

Resumen

Los bacteriófagos son virus que infectan de manera específica a las bacterias, y en su fase lítica producen la lisis bacteriana. En la actualidad, la resistencia bacteriana a los antibióticos es un grave problema sanitario; y en este sentido, los bacteriófagos han recuperado su importancia como agentes para el control de las infecciones bacterianas. La incorporación de los bacteriófagos en microfibras de polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) permite la liberación controlada de los bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas.

Por otro lado, las protaminas (PNH) son proteínas básicas de bajo peso molecular, ricas en arginina, y son responsables del empaquetamiento del DNA mediante interacción electrostática. Por ello, esta proteína puede ser considerada como un polication, que puede interactuar con la carga negativa de la estructura de los bacteriófagos.

Con estas consideraciones, en este TFG se propone como objetivo el estudio de la preparación de una nueva matriz de microfibras basadas en la mezcla de ácido poliláctico con un peso de entre 1-2% de PNH, como plataforma para la adsorción de bacteriófagos. Estas matrices de microfibras serán fabricadas mediante la técnica de *electrospinning* desde una mezcla de PLA y PNH, siendo finalmente los bacteriófagos adsorbidos en las matrices.

Estas matrices serán caracterizadas por diversos métodos microscópicos (óptico y electrónico) y espectroscópicos (FTIR y UV-Vis), como también se estudiará su hidrofobicidad mediante la medida de ángulos de contacto. Asimismo se cuantificará la PNH en la matriz, mediante ensayos de electroforesis y absorbancia por espectroscopía ultravioleta-visible, y se estudiará su estabilidad. Finalmente la actividad antibacteriana será evaluada por ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano de la especie *Staphylococcus aureus* en medio líquido (caldo de cultivo) y en medio sólido (placas de agar).

Los resultados demuestran que los bacteriófagos pueden ser incorporados en las microfibras poliméricas biodegradables, conservando su actividad biológica. El desarrollo de estas nuevas matrices abre un camino prometedor para el uso de nuevo material biomédico para el control de las infecciones bacterianas.

Resum

Els bacteriòfags són virus que infecten de manera específica als bacteris, i en la seva fase lítica produeixen la lisi bacteriana. A l'actualitat, la resistència bacteriana als antibiòtics és un greu problema sanitari; i en aquest sentit, els bacteriòfags han recuperat la seva importància com a agents per al control de les infeccions bacterianes. La incorporació dels bacteriòfags en microfibres de polímers biodegradables com l'àcid polilàctic (PLA) permet l'alliberament controlat dels bacteriòfags per al tractament d'infeccions bacterianes.

D'altra banda, les protamines (PNH) són proteïnes bàsiques de baix pes molecular, riques en arginina, i són responsables de l'empaquetament del DNA mitjançant interacció electrostàtica. Per això, aquesta proteïna pot ser considerada com un policatió, que pot interaccionar amb la càrrega negativa de l'estructura dels bacteriòfags.

Amb aquestes consideracions, en aquest TFG es proposa com a objectiu l'estudi de la preparació d'una nova matriu de microfibres basades en la mescla d'àcid polilàctic amb un pes d'entre 1-2% de PNH, com a plataforma per a l'adsorció de bacteriòfags.

Aquestes matrius de microfibres seran fabricades mitjançant la tècnica d'*electrospinning* des d'una mescla de PLA i PNH, sent finalment els bacteriòfags adsorbits a les matrius. Aquestes matrius seran caracteritzades per diversos mètodes microscòpics (òptic i electrònic) i espectroscòpics (FTIR i UV-Vis), com també s'estudiarà la hidrofobicitat mitjançant la mesura d'angles de contacte. Així mateix es quantificarà la PNH en la matriu, mitjançant assajos d'electroforesis i absorbència per espectroscòpia ultraviolada-visible, i s'estudiarà la seva estabilitat. Finalment, l'activitat antibacteriana serà avaluada per assajos d'inhibició del creixement bacterià de l'espècie *Staphylococcus aureus* a medi líquid (brou de cultiu) i en medi sòlid (plaques de agar).

Els resultats demostren que els bacteriòfags poden ser incorporats en les microfibres polimèriques biodegradables, conservant la seva activitat biològica. El desenvolupament d'aquestes noves matrius obre un camí prometedor per a l'ús de nou material biomèdic per al control de les infeccions bacterianes.

Abstract

Bacteriophages are viruses that specifically infect bacteria, and in their lytic phase produce bacterial lysis. At present, bacterial resistance to antibiotics is a serious health problem; and in this sense, bacteriophages have regained importance as agents for the control of bacterial infections. The incorporation of bacteriophages into microfibers of biodegradable polymers such as polylactic acid (PLA) allows the controlled release of bacteriophages to treat bacterial infections.

On the other hand, protamines (PNH) are proteins with low molecular weight, rich in arginine and they are responsible for the packaging of DNA by electrostatic interaction. Therefore, this protein can be considered as a polycation, which can interact with the negative charge of the bacteriophage structure.

With these considerations, this TFG aims to study the preparation of a new matrix of microfibers based on the mixture of polylactic acid with a weight among 1-2% of PNH, as a platform for the adsorption of bacteriophages. These microfiber matrices are manufactured by the electrospinning technique from a mixture of PLA and PNH, and finally the bacteriophages are adsorbed onto the matrices.

These matrices are characterized by various microscopic (optical and electronic) and spectroscopic (FTIR and UV-Vis) methods, as well as hydrophobicity by measuring contact angles. PNH was quantified in the matrix, by electrophoresis and ultraviolet-visible spectroscopy, and its stability will also be studied. Finally the antibacterial activity was evaluated by bacterial growth inhibition assays of the species *Staphylococcus aureus* in liquid medium (culture broth) and in solid medium (agar plates).

The results demonstrate that bacteriophages can be incorporated into the biodegradable polymer microfibers, retaining their biological activity. The development of new matrices opens a promising path for the use of new biomedical material for the control of bacterial infections.

Glosario

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

siARN: Ácido ribonucleico de interferencia

CH₃COOH: Ácido acético

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

ES: Electrospinning o electrohilado

FTIR: Espectroscopía de radiación infrarroja (Fourier transform infrared spectroscopy)

HCOOH: Ácido fórmico

HCl: Ácido clorhídrico

HPLC: High performance liquid chromatography

IC: Intervalo de confianza

IR: Radiación infrarroja

MDR: Múltiple droga resistentes

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

p.e.: Por ejemplo

PLA: Ácido poliláctico

PNH: Protamina

OM: Microscopía óptica

SE: Desviación estándar

SEM: Microscopía electrónica de barrido

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TGA: Termogravimetría

TM GPAU: Tampón de muestras gel de poliacrilamida acético/urea

UV-Vis: Radiación ultravioleta visible



Índice

| | |
|---|------------|
| RESUMEN | I |
| RESUM | II |
| ABSTRACT | III |
| GLOSARIO | IV |
| 1. PREFACIO | 1 |
| 1.1. Origen del trabajo..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1. Objetivos del trabajo | 3 |
| 2.1.1. Objetivos generales | 3 |
| 2.1.2. Objetivos específicos..... | 3 |
| 2.2. Alcance del trabajo | 4 |
| 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS | 5 |
| 3.1. Polímeros..... | 5 |
| 3.1.1. Breve historia | 5 |
| 3.1.2. Clasificación..... | 5 |
| 3.1.3. Polímeros biodegradables | 6 |
| 3.3. Electrohilado (<i>Electrospinning</i>) | 9 |
| 3.3.1. Generalidades | 9 |
| 3.3.2. Principales parámetros del proceso | 10 |
| 3.4. Bacteriófagos | 12 |
| 3.4.1. Introducción | 12 |
| 3.4.2. Características | 12 |
| 3.4.3. Ventajas de los bacteriófagos frente a los antibióticos..... | 14 |
| 3.4.4. Aplicaciones de bacteriófagos | 15 |
| 3.5 Protamina | 16 |
| 3.5.1. Introducción | 16 |
| 3.5.3. Funciones biológicas | 17 |
| 3.5.4. Aplicaciones | 17 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 4.1. Preparación de la disolución de PLA con protamina | 19 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2. | Electrospinning..... | 20 |
| 4.3. | Caracterización de las matrices de PLA: Morfología y diámetro de las fibras..... | 21 |
| 4.3.1. | Microscopía óptica (MO)..... | 21 |
| 4.3.2. | Microscopía electrónica de barrido (SEM)..... | 21 |
| 4.4. | Ángulos de Contacto | 22 |
| 4.5. | Espectrómetro IR | 24 |
| 4.6. | Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA)..... | 25 |
| 4.6.1. | Análisis termogravimétrico (TGA)..... | 25 |
| 4.6.2. | Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 25 |
| 4.7. | Cuantificación de la protamina en las matrices de PLA | 25 |
| 4.7.1. | Espectroscopía ultravioleta | 25 |
| 4.7.2. | Curva de calibrado..... | 27 |
| 4.7.3. | Electroforesis | 27 |
| 4.8. | Ensayos biológicos | 30 |
| 4.8.1. | Preparación de matrices de PLA con bacteriófagos. | 30 |
| 4.8.2. | Preparación del cultivo de bacterias..... | 31 |
| 4.8.3. | Lectura y cuantificación de bacterias..... | 32 |
| 4.8.4. | Ensayo cualitativo de bacteriófagos..... | 33 |
| 5. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 37 |
| 5.1. | Preparación PLA-Protamina..... | 37 |
| 5.1.1. | Disolución de PLA | 37 |
| 5.1.2. | Pruebas de solubilidad de protamina | 37 |
| 5.2. | Características físicas de las microfibras de PLA | 39 |
| 5.2.1. | Diámetro y morfología de las fibras..... | 39 |
| 5.2.2. | Ángulos de contacto..... | 41 |
| 5.2.3. | Análisis FTIR del PLA, PLA-Protamina y Protamina | 43 |
| 5.2.4. | Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA) | 44 |
| 5.2.5. | Determinación de la protamina en la matriz | 47 |
| 5.3. | Interacción protamina – bacteriófagos | 53 |
| 5.4. | Ensayos biológicos..... | 55 |
| 5.4.1. | Cultivos en placas agar: Observación de calvas..... | 55 |
| 5.4.2. | Cultivos en placas de agar: Observación de halos | 56 |
| 5.4.3. | Cultivos en medio líquido: Inhibición del crecimiento bacteriano..... | 58 |
| 6. | ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD | 61 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 6.1. Impacto ambiental..... | 61 |
| 6.2. Impacto social..... | 63 |
| 7. EVALUACIÓN ECONÓMICA..... | 65 |
| CONCLUSIONES..... | 69 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 71 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 73 |

1. Prefacio

1.1. Origen del trabajo

El presente proyecto tiene su origen en el grupo de investigación de Polímeros Sintéticos, Estructura y Propiedades (PSEP) del Departamento de Ingeniería Química de la EEBE (Escuela de Ingeniería de Barcelona Este) de la UPC (Universidad Politécnica de Cataluña), con una importante trayectoria en la conformación de polímeros biodegradables mediante la técnica del electrohilado o *electrospinning*.

Una de las principales áreas de investigación recae en la investigación de materiales poliméricos biodegradables y su desarrollo para aplicaciones biomédicas. Por ello, en el PSEP se han realizado diversos trabajos de conformado de poliésteres, poliesteramidas y poliureas mediante la técnica de electrohilado, obteniéndose matrices de fibras de escala micro y/o nanométricas. Además, la técnica de electrospinning ha permitido obtener fibras cargadas con moléculas bioactivas tales como fármacos antimicrobianos, drogas antitumorales y antiinflamatorios.

El actual PFC pretende seguir esta línea de investigación sobre los sistemas de liberación basados en matrices de micro/nanofibras. A partir de la adsorción de bacteriófagos (sistema natural biológico) sobre estas fibras, se abre un camino prometedor como un nuevo material antibacteriano alternativo al uso de antibióticos.

2. Introducción

2.1. Objetivos del trabajo

2.1.1. Objetivos generales

En la actualidad el tratamiento de enfermedades infecciosas requiere de nuevas drogas y/o estrategias frente a la emergencia de bacterias múltiple droga resistentes (MRD).

Los primeros usos de los bacteriófagos como agente antibacteriano se remontan a los años 1940 en la Unión Soviética como alternativa a los antibióticos para tratar algunas infecciones bacterianas. Debido al consumo abusivo de los antibióticos en la actualidad y su consecuente eficacia decreciente, el uso de bacteriófagos ha ganado importancia, siendo una importante alternativa al tratamiento antibiótico de diversas infecciones bacterianas.

Por otro lado, la conformación de los polímeros biodegradables mediante la técnica de electrohilado o electrospinning permite obtener nuevas matrices de micro/nanofibras, cuya aplicación en el área biomédica sirve de plataforma para el crecimiento celular y dispositivo de liberación de drogas y fármacos de una manera controlada.

En este sentido, en este PFC se estudiará la conformación, mediante la técnica de electrohilado o electrospinning, de matrices de fibras del poliéster ácido poliláctico (PLA) cargadas con protamina (PNH), para promover la adsorción de bacteriófagos, con el objetivo general de lograr la inhibición del crecimiento bacteriano.

2.1.2. Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo general se han propuesto de manera secuencial los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinar las condiciones óptimas de la carga de protamina en la matriz de PLA para realizar el electrohilado, considerando como parámetros de partida la utilización de un disolvente de cloroformo/acetona (2v/1v). El electrohilado de PLA sin carga de protamina será utilizado como control de referencia.
- 2) Evaluar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) las características morfológicas de las fibras, determinando su diámetro.
- 3) Determinar la hidrofobicidad de las matrices de PLA y PLA-Protamina.
- 4) Cuantificar y establecer la distribución homogénea de la protamina cargada en las matrices de PLA.
- 5) Confirmar la presencia de protamina tras ser sometida al electrohilado. Para ello se utilizará la técnica de electroforesis.
- 6) Estudiar la interacción entre la protamina y los bacteriófagos mediante la técnica de electroforesis.

7) Determinar la actividad biológica de los bacteriófagos libres y las matrices cargadas con bacteriófagos adsorbidos. Para ello, se realizarán experimentos de inhibición del crecimiento bacteriano en placa de agar y caldo de cultivo, como demostración cualitativa y cuantitativa, respectivamente, de la actividad bactericida de los bacteriófagos. Estos ensayos se realizarán de acuerdo a la especificidad de los bacteriófagos *Staphylophages*, usando la bacteria *Staphylococcus aureus*.

2.2. Alcance del trabajo

Este trabajo tiene como alcance general, el diseño de un nuevo material compuesto conformado como una matriz de PLA/Protamina con capacidad de adsorción de bacteriófagos mediante la interacción bacteriófago-protamina que correspondería al tipo de interacción electrostática (carga-carga). La finalidad de este diseño es permitir la liberación controlada de los bacteriófagos cuando este nuevo material sea usado para el tratamiento y/o prevención de infección bacteriana durante el cierre de heridas u otras aplicaciones de la ingeniería de tejidos.

- Estudio de una disolución de PLA-PNH óptima para obtener matrices a partir del electrohilado.
- Estudio de las características morfológicas y la hidrofobicidad de la superficie de las microfibras de la matriz PLA-PNH.
- Estudio de la actividad antibacteriana de las matrices y bacteriófagos mediante ensayos de liberación en caldo de cultivo y agar.
- Estudio del impacto ambiental que el desarrollo de este estudio pueda tener sobre la salud y el medio ambiente.
- Estudio de un presupuesto que cubra la totalidad de los gastos destinados al desarrollo de este proyecto.

3. Fundamentos teóricos

3.1. Polímeros

Los polímeros son macromoléculas que se forman por la unión covalente de pequeñas unidades de monómeros. El proceso químico que permite la combinación de los monómeros se denomina reacción de polimerización. Las unidades de monómeros que se repiten se denominan unidad constitucional repetitiva (UCR) o unidad monomérica. El número de unidades monoméricas que componen la cadena polimérica se conoce como grado de polimerización (χ) (1).

3.1.1. Breve historia

Los polímeros naturales, p.e., la lana, la seda, la celulosa, etc., se han empleado extensamente desde la antigüedad y han tenido mucha importancia a lo largo de la historia para satisfacer las distintas necesidades de los seres humanos. Por otra parte, los primeros polímeros sintéticos fueron obtenidos a partir de la transformación de polímeros naturales a finales del siglo XIX, siendo descubrimientos importantes el vulcanizado de caucho (Charles Goodyear, 1839), la nitrocelulosa (Christian Schönbein, 1846) y la dinamita (Alfred Nobel, 1875).

Pero no fue hasta 1909 cuando se obtuvo el primer polímero totalmente sintético, gracias al químico belga Hendrik Baekeland que sintetizó la baquelita a partir de formaldehído y fenol. En 1922, el químico alemán Hermann Staudinger comienza a estudiar los polímeros, y en 1926 expone su hipótesis de que se trata de largas cadenas de unidades pequeñas unidas por enlaces covalentes, recibiendo el Premio Nobel de Química por su trabajo en 1953.

Desde entonces el desarrollo de nuevas tecnologías, materiales y aplicaciones de los polímeros ha sido exponencial. En el mundo contemporáneo, los polímeros sintéticos están presentes en todos los ámbitos del desarrollo y la elaboración de productos manufacturados, sustituyendo materiales usados tradicionalmente, tales como la madera, metales y materiales cerámicos. Algunos materiales encuentran aplicación en campos tan diversos como la medicina, la ingeniería, la agricultura, etc (2).

3.1.2. Clasificación

Los polímeros son clasificados conforme a diferentes características:

3.1.2.1. Según el origen

- *Polímeros naturales*: Son los que se pueden presentar en la naturaleza (reino vegetal y animal), como la celulosa, el caucho natural, las resinas, etc.
- *Polímeros sintéticos*: Son los que se obtienen por vía puramente sintética a partir de sustancias de bajo peso molecular. Sería un ejemplo el Nylon.
- *Polímeros semisintéticos*: Son los obtenidos por la transformación química de los polímeros naturales, sin que se destruya de modo apreciable su naturaleza macromolecular. Es el caso de la seda artificial, obtenida a partir de la celulosa (3).

3.1.2.2. Según su forma

- *Polímeros lineales*: Se originan cuando el monómero que lo forma tiene dos puntos reactivos o de ataque químico, de modo que el polímero se forma unidireccionalmente, formando cadenas lineales.

- *Polímeros ramificados*: Se forman porque el monómero posee tres o más puntos reactivos de ataque químico, de modo que la polimerización ocurre tridimensionalmente, es decir, en las tres direcciones del espacio (3).

3.1.2.3. Según el tipo de monómeros

- *Homopolímeros*: Están constituidos por una sola clase de monómeros.
- *Copolímeros*: Están constituidos por dos o más clases de monómeros, dispuestos al azar, alternadamente, en bloques o siendo injertados en una cadena principal (3).

3.1.2.4. Según sus propiedades físicas

- *Termoestables*: No fluyen, al calentarlos se descomponen químicamente. Este comportamiento se debe a una estructura con muchos entrecruzamientos, que impiden los desplazamientos relativos de las moléculas.
- *Elastómeros*: Plásticos con un comportamiento elástico que pueden ser deformados fácilmente sin que se rompan sus enlaces o se modifique su estructura.
- *Termoplásticos*: Fluyen al calentarlos y se vuelven a endurecer al enfriarlos. Su estructura molecular presenta pocos entrecruzamientos o ninguno (3).

3.1.2.5. Según su mecanismo de formación

- *Polímeros de adición*: Son polímeros cuyas macromoléculas se han formado por unión de moléculas monómeras no saturadas. Ej: el polietileno.
- *Polímeros de condensación*: Son polímeros cuyo enlace entre las macromoléculas son multifuncionales, con separación de algún producto de bajo peso molecular. Ej: Nylon, las proteínas.
- *Polímeros poliaductos*: Son aquellos cuyo enlace entre las macromoléculas es multifuncional, sin separación de moléculas sencillas. Ej: poliuretanos y resinas (3).

3.1.2.5. Según la composición química de la cadena principal

- *Polímeros homocadena*: Son aquellos en los que la cadena principal no contiene heteroátomos. Dentro de este grupo de polímeros, se distinguen cinco familias principales: las Poliolefinas, los Poliestirénicos, los insaturados (polienos), los polivinilos y los poliacrílicos.
- *Polímeros heterocadena*: En esta clase de polímeros (que contienen heteroátomos en la cadena principal) hay tantas familias como funciones químicas, distinguiéndose en cada caso los tipos A-B y A-A-B-B según que las funciones complementarias de los monómeros estén sobre la misma molécula o no (3).

3.1.3. Polímeros biodegradables

En la actualidad existen numerosos y diferentes tipos de polímeros de uso frecuente en el campo de la biomedicina, con también aplicaciones en el campo de la química, la industria, etc. Los polímeros biodegradables son muy importantes en el campo de los implantes en los organismos humanos. P.e. el polihidroxialcanoato (PHA) y el ácido poliláctico (PLA) tienen aplicaciones en la liberación controlada de droga en operaciones orales. Estas sustancias son biocompatibles al no ser tóxicas para los microorganismos y siendo compatibles con los tejidos humanos pudiendo ser biodegradadas por el cuerpo tiempo después de haber sido implantadas, produciendo productos de carácter no tóxicos, que pueden eliminarse por el propio organismo o incluso ser metabolizados por él. Este hecho químico es de gran importancia para el campo de la medicina, y ha significado un gran adelanto y mejora en la calidad de vida de los pacientes.

Hay diferentes características que deben poseer los materiales biodegradables para poder ser utilizados en el cuerpo humano a modo de implantes, p.e., los materiales no deben tener carácter mutagénico, cancerígeno, antigénicos, tóxicos o no antisépticos. Deben ser fácilmente esterilizables, y por supuesto compatibles con los tejidos que lo albergarán, así como también deben ser fácilmente conformados de manera sencilla para utilizarlos dependiendo de los requisitos impuestos. Así, en la actualidad, la mayor parte de las investigaciones en cuanto a los polímeros se encuentran dirigidas a su uso en aplicaciones biomédicas, como las anteriormente mencionadas, destacando el desarrollo de polímeros de origen sintético.

En lo que a la naturaleza de los polímeros se refiere, podemos destacar dos grandes familias de éstos, una de origen sintético, p.e., el ácido poliláctico (PLA), y otra de origen natural, p.e, el colágeno. Los primeros polímeros degradables que se sintetizaron, así como los más usados, son los que se consiguieron partiendo del ácido poliglicólico (PGA), y del ácido poliláctico (PLA), los cuales son de gran utilidad en la industria biomédica, empezando por las suturas biodegradables, que comenzaron a utilizarse legalmente en el año 1960. Desde entonces, se han desarrollado numerosos compuestos basados tanto en el PGA como en el PLA, así como también otros tipos de materiales, como pueden ser la polidioxanona, o copolímeros de policaprolactona que han sido aceptados como materiales de uso biomédico. Además de estos materiales, podemos encontrar polianhídridos y poliortoésteres. Además, la síntesis de polímeros biodegradables es un campo en constante investigación y avance, por lo cual actualmente se encuentran muchos otros compuestos bajo estudio.

También cabe destacar que en la actualidad se están sustituyendo los polímeros plásticos por polímeros biodegradables, con la finalidad de reducir la contaminación que provocan los materiales plásticos, mostrando la preocupación social por el medio ambiente. Así, los desechos que producen los polímeros biodegradables pueden ser tratados como si de restos de tipo orgánico se tratase. Los polímeros biodegradables tardan menos tiempo en descomponerse, ya que su formación química es distinta a un polímero basado en la petroquímica. Muchos de los polímeros biodegradables son sintetizados por bacterias, p.e., en la síntesis del PLA y polihidroxicanoatos (PHAs). (4)(5)

3.1.3.1. Ácido poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, que ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares (6).

- Síntesis: La síntesis del PLA fue estudiada por Carothers en 1932. Generalmente, se lleva a cabo la polimerización por apertura del anillo de diéster cíclico (*Figura 3.1*). Diferentes compuestos metálicos, organometálicos e inorgánicos de Zn y estaño han sido usados como iniciadores. Sin embargo, el tetrafenil de estaño, el cloruro estañoso y el octato estañoso son los más efectivos (6)(7).

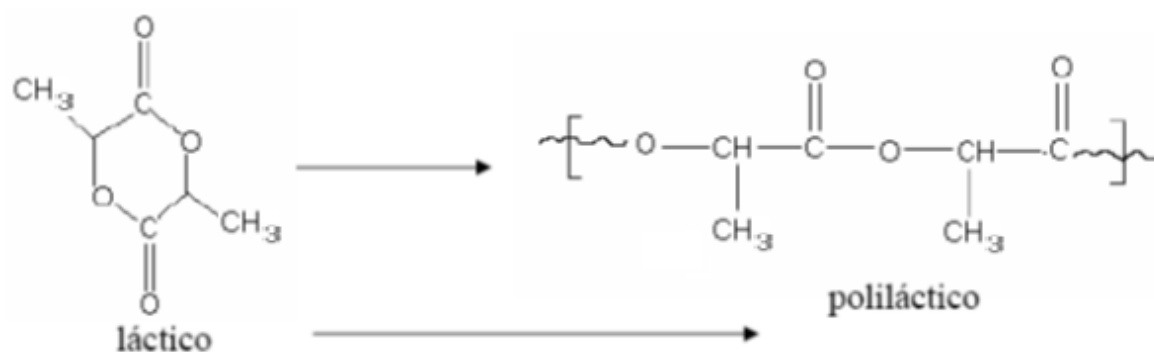


Figura 3.1. Síntesis del ácido poliláctico por apertura del anillo de diéster cíclico.

- **Propiedades:** La configuración L-PLA es un polímero cristalino o semicristalino con un módulo de Young relativamente alto (2.7 GPa) y una degradación de más de 24 meses. Mientras que mezclas de configuraciones D,L-PLA corresponden a polímeros amorfos con un módulo de Young de 1.9 GPa, con una degradación de 12 a 16 meses. Sus propiedades mecánicas son muy bajas en comparación a materiales metálicos como el acero, pero no son tan lejanas a las propiedades mecánicas de algunos tejidos biológicos como p.e., el tejido óseo. Lo más destacable del PLA es su tiempo de degradación que depende de su ordenamiento cristalino (6)(7).
- **Biocompatibilidad:** El ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en las células. El uso de este hidroxiaácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico, puesto que la acumulación del ácido láctico puede generar una serie de problemas fisiológicos. Los α -poliésteres, como el PLA, se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada in-vivo por la presencia de enzimas, lo cual conlleva a la liberación de su monómero (ácido láctico). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación entrando en la ruta metabólica de las células (*Figura 3.2*).

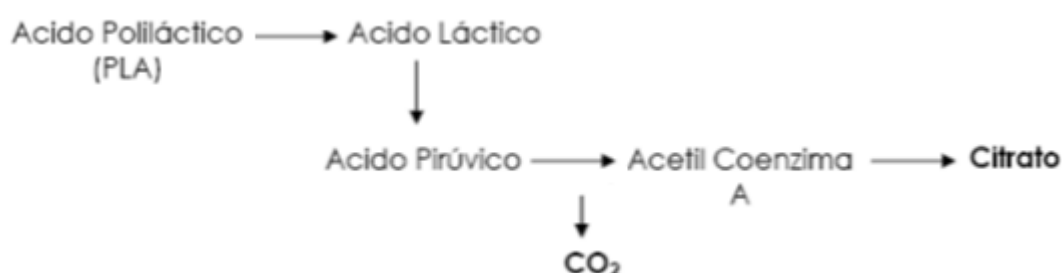


Figura 3.2. Ruta de degradación del ácido poliláctico en el organismo.

La ruta metabólica del ácido láctico comienza con la transformación de lactato a piruvato por la acción de la enzima lactato dehidrogenasa; luego, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa para producir acetilcoenzima A. Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo del ácido cítrico), el cual se realiza en las mitocondrias obteniéndose como resultado por fosforilación oxidativa: ATP más agua y dióxido de carbono, estos dos subproductos son eliminados en la respiración y excretados por los riñones (6)(7).

- Aplicaciones: El PLA es actualmente utilizado como materia primera para preparar diversos materiales y dispositivos de aplicación biomédica. Por ejemplo, el PLA es usado en clavos para la unión de ligamentos y reparación de meniscos, suturas, tornillos y clavos para la fijación de fracturas y cirugía maxilofacial, liberación de fármacos y stents para cirugía cardiovascular. Gracias a la biodegradabilidad es posible su uso en la liberación controlada de fármacos, teniendo utilidad en el ámbito de la medicina e incluso en el tratamiento de aguas.

Una de las aplicaciones más recientes del PLA, la encontramos en el campo de la ingeniería de tejidos, la cual se basa en generar tejidos a partir de células del mismo paciente o de un donador compatible cuyo crecimiento es guiado in-situ mediante andamios reabsorbibles (scaffolds). Actualmente, se encuentran en el mercado productos basados en ingeniería de tejidos para la reparación de tejido cutáneo. Otros tejidos como el óseo y el cartilaginoso se encuentran todavía en fase de desarrollo (5)(6)(7).

3.3. Electrohilado (*Electrospinning*)

3.3.1. Generalidades

El proceso de electrospinning (ES) permite obtener fibras gracias al estiramiento coaxial de una solución viscoelástica, resultando fibras de diámetros del tamaño de micras y nanómetros, medidas que hacen posible características únicas, tales como la gran área superficial en relación al pequeño volumen, flexibilidad en la superficie, alta porosidad, poros interconectados y un rendimiento mecánico superior comparado con otras formas ya conocidas del material. Estas características hacen de las electrofibras candidatos óptimos para una variedad de aplicaciones, entre ellas: ingeniería de tejidos, textiles, elementos para cubrir heridas, medios de filtración, membranas especiales y diversas aplicaciones médicas tales como reemplazo de huesos, implantes dentales, sistemas de liberación de fármacos, injertos vasculares o vasos sanguíneos artificiales entre otros.

La técnica consiste en aplicar disoluciones de polímero a través de altos campos eléctricos, aplicando suficiente fuerza eléctrica para superar las fuerzas de la tensión superficial en la disolución del polímero cargado. De esta forma a un voltaje determinado, finos chorros de disolución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector. Este efecto electrostático sobre la gota de disolución del polímero en la punta del capilar es lo que se conoce como cono de Taylor. El chorro se mueve en la dirección del campo eléctrico, desplegándose de acuerdo a las fuerzas externas e internas y experimentando inestabilidad en algunas ocasiones. Durante este movimiento, el disolvente se evapora y el polímero se solidifica formando las fibras que son depositadas al azar sobre el plato colector (8)(9).

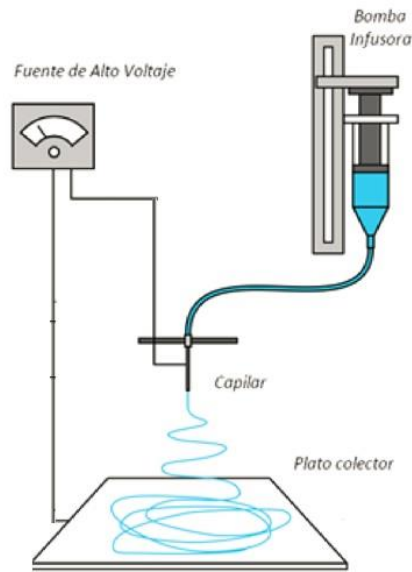


Figura 3.3. Esquema de un montaje de electrospinning.

En la *Figura 3.3* se muestra un esquema típico de un equipo de electrospinning en posición vertical. En la parte superior se inyecta la disolución de polímero en una jeringa de inyección, a una presión y flujo controlado por la bomba de infusión o perfusión. A esta jeringa se le aplica un alto potencial eléctrico que suele oscilar entre los 0-30kV, y se genera un campo eléctrico en la región comprendida entre el extremo de la jeringa (aguja metálica) y el colector. Debido a este campo y al fenómeno de polarización y carga, la solución se deposita en la placa (8).

3.3.2. Principales parámetros del proceso

3.3.2.1. Voltaje

El voltaje es uno de los parámetros más importantes dentro del proceso de electrospinning, afirmando algunos autores que la aplicación de altos voltaje aumentan el flujo del chorro, lo que resulta en fibras con mayores diámetros, siendo una afirmación contradictoria ya que otros autores argumentan que un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos (beads). Lo cierto es que en la mayoría de los casos un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, promoviendo una reducción en el diámetro de las fibras. La influencia del voltaje depende además de las propiedades viscoelásticas del material base, por ello es importante analizar el comportamiento para cada polímero con su respectivo disolvente (8).

3.3.2.2. Flujo de salida

Un flujo de salida menor conlleva que el disolvente tenga más tiempo para evaporarse evitando la formación de defectos en las fibras. Por otra parte, cuando el flujo de salida se incrementa, también aumenta el diámetro de las fibras y posiblemente el tamaño de los defectos. Un mínimo valor de volumen de solución a la salida del capilar debe ser mantenido para obtener un cono de Taylor estable (8).

3.3.2.3. Distancia entre punta de aguja y colector

Dependiendo de las propiedades de la solución el efecto de la variación de la distancia puede tener efecto en la morfología de las fibras. Al trabajar con distancias muy grandes las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso, especialmente si las fibras son de diámetro pequeño. Una mínima distancia es requerida para dar a las fibras el tiempo suficiente para que el disolvente se evapore antes de alcanzar el plato colector, con distancias muy grandes o demasiado pequeñas se ha observado la aparición de beads o fibras húmedas que promueven la obtención de fibras aplanadas o con forma de cintas. La mayoría de los autores coinciden en que con mayores distancias la solución tendrá mayor tiempo de vuelo lo que promoverá un mayor estiramiento de las fibras antes de depositarse en el plato colector (8).

3.4. Bacteriófagos

3.4.1. Introducción

Los bacteriófagos o simplemente fagos, son unos virus que infectan exclusivamente bacterias, produciendo la lisis bacteriana. Se conocen más de 5000 tipos de bacteriófagos con diferentes especificidades bacterianas.

El descubrimiento de su actividad en la lisis bacteriana se remonta finales del siglo XIX, por Ernest Hankin, que manifestó la presencia de actividad antibacteriana en las aguas del río Ganges y Junma, en la India. Pero no fue hasta los años 1910 cuando el microbiologista Felix d'Herelle determinó durante sus investigaciones que se trataba de unos virus, que él mismo apodó bacteriófagos, y que más tarde en el 1919 utilizaría para curar a un paciente de disentería.

Durante los años 1940 en EEUU y en la antigua Unión Soviética, comienza la producción comercial de bacteriófagos, aunque la eficacia de los bacteriófagos para el tratamiento de enfermedades infecciosas se volvió controvertida, cayendo en desuso frente a la proliferación de los antibióticos en el oeste de Europa, quedando su uso y estudio limitado a países del este, principalmente Rusia, Polonia y Georgia. En la actualidad, debido a las negativas consecuencias del abuso de antibióticos, se ha recuperado la investigación en los países del oeste de Europa y EEUU (10).

3.4.2. Características

Como cualquier tipo de virus, los bacteriófagos presentan diversidad de familias en función de su forma y material genético. Están constituidos por una cubierta proteica, conocida como cápside, que envuelve su material genético. Estos virus suelen tener un tamaño que oscila entre 20 y 200 nm, y en función de su estructura, pueden clasificarse como filamentosos, helicoidales o icosaedros. La *Figura 3.4* muestra las distintas partes que componen un bacteriófago con estructura icosaédrica. Como puede comprobarse, contiene el material genético en el interior de la cápside. Además presenta unos puntos de anclaje o espículas, que son empleados para adherirse a las bacterias e inyectarles su material genético (11).

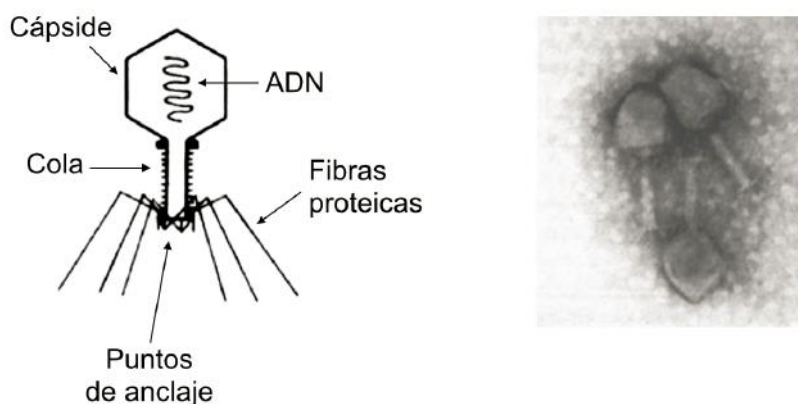


Figura 3.4. A la izquierda estructura y partes de un bacteriófago, a la derecha imagen de TEM de un grupo de bacteriófagos (x141000 aumentos).

Por otra parte hay estudios que manifiestan la carga neta negativa los bacteriófagos, la cual puede interaccionar electrostáticamente con superficie cargadas positivamente. La existencia de una carga negativa en la cápside. (12) (13).

Los bacteriófagos se acoplan de manera específica a la superficie bacteriana mediante receptores. Cualquier acoplamiento empieza con un reconocimiento entre la bacteria y el bacteriófago a través de sus receptores, que deriva en un ciclo de replicación lítico o bien lisogénico, después de que el bacteriófago haya introducido su material genético en la bacteria.

El ciclo lítico implica la destrucción por lisis de la bacteria que hospeda al bacteriófago, tras la replicación y encapsulación de las partículas virales, de tal modo que los nuevos virus quedan libres para infectar a otras células bacterianas. Por el contrario, el ciclo lisogénico no implica una lisis celular inmediata. El bacteriófago inserta su genoma a la bacteria, y éste se integra en el ADN de la bacteria y se replica como si de un genoma bacteriano se tratase, de modo que es transmitido a toda la progenie de la bacteria infectada cada vez que ésta se divide por fisión. A diferencia del ciclo lítico, en ciclo lisogénico el bacteriófago permanece en un estado de latencia en el interior de la célula bacteriana hasta que las condiciones en su entorno no son propicias, como p.e. por falta de nutrientes. En este momento los fagos se activan y producen la muerte de la bacteria por lisis celular. La *Figura 3.5* muestra comparativamente cómo se desarrollan los ciclos de replicación, lítico y lisogénico (11)(14).

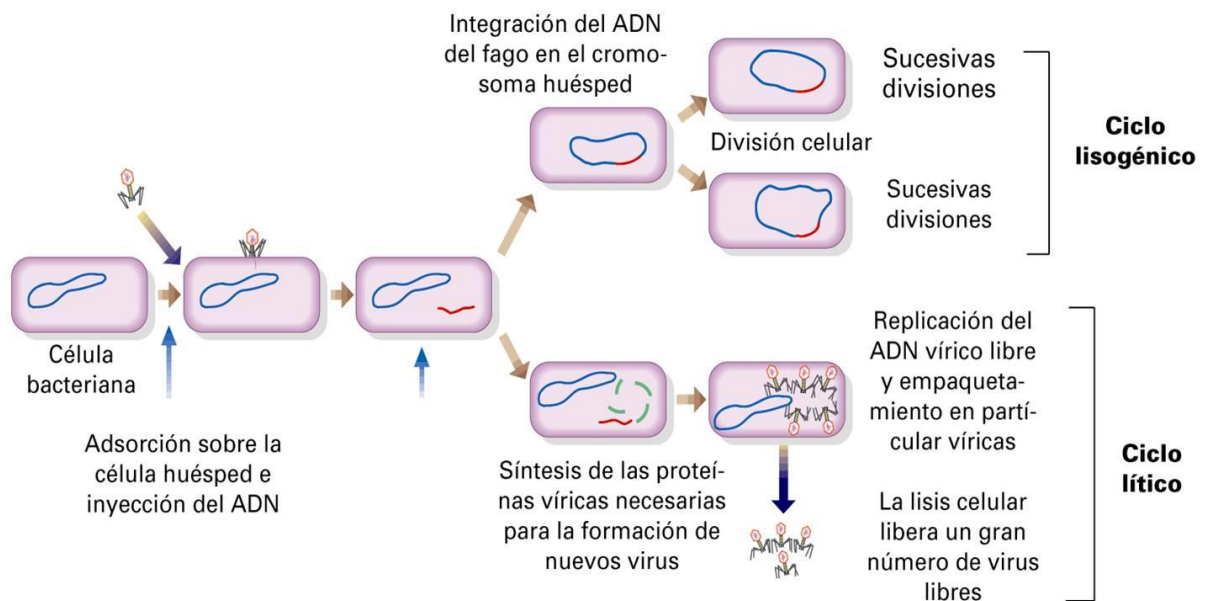


Figura 3.5. Ciclos de replicación lítico y lisogénico de los bacteriófagos.

Como puede verse en cuanto al ciclo lítico, el bacteriófago se adhiere primero a la bacteria mediante sus espículas. Seguidamente, inyecta su material genético a la bacteria huésped y posteriormente se replica, generándose nuevas cápsides. En la cuarta etapa, las distintas partes formadas que conforman el bacteriófago se unen entre sí, y una vez éstos son maduros, se liberan de la bacteria por lisis, causándole la muerte.

En el ciclo lisogénico, las dos primeras etapas son muy parecidas a las del ciclo lítico; es en la tercera etapa donde las diferencias se hacen evidentes, pues los bacteriófagos que llevan a cabo un ciclo lisogénico

pueden iniciar un ciclo reproductivo parecido al del ciclo lítico, o bien pueden integrar su material genético dentro del cromosoma bacteriano, de modo que las bacterias pueden replicarse del modo habitual durante diversas generaciones, o espontáneamente y como consecuencia de algún agente inductor externo, como puede ser la radiación, el material genético del bacteriófago se suprime del material genético de la bacteria dando lugar a fragmentos aislados de ADN del bacteriófago, que tal y como sucede en el ciclo lítico, acabarían dando lugar a los nuevos bacteriófagos.

El tiempo que tarda un bacteriófago en replicarse depende de cada caso; puede llegar a darse en cuestión de media hora. La cantidad de virus que pueden liberarse por la infección de una bacteria suele ser de entre 50 y 100, además de fragmentos de material genético y recubrimientos proteicos (14).

3.4.3. Ventajas de los bacteriófagos frente a los antibióticos

El uso de antibióticos o bacteriófagos en el tratamiento de enfermedades persigue un objetivo común: combatir las infecciones bacterianas. Sin embargo los bacteriófagos presentan una serie de ventajas en el modo en que actúan para combatirlas, teniendo consecuencias muy distintas para el cuerpo humano. A continuación se resumen las diferentes ventajas que otorga el uso de los bacteriófagos:

- Los antibióticos afectan tanto a las bacterias patógenas como al equilibrio de la microflora natural del organismo, que tiene efectos positivos sobre el mismo; en consecuencia, podrían desarrollarse infecciones secundarias, alergias o desarreglos intestinales. Sin embargo, los bacteriófagos sólo son capaces de combatir aquellas familias de bacterias que presentan los receptores específicos, por lo que la microflora natural no se vería afectada tras su uso, limitando por consiguiente el desarrollo de infecciones secundarias.
- Los antibióticos y bacteriófagos también se diferencian entre sí en su radio de acción; los antibióticos no se concentran solamente en el lugar dónde se concentra la infección, sino que se distribuyen de manera general, se metabolizan y finalmente se eliminan del cuerpo. Sin embargo, los bacteriófagos necesitan de las bacterias para poder replicarse, es por ello que se encuentran concentrados en el lugar dónde hay infección. Éstos son eliminados de manera rápida por el sistema inmune.
- Los antibióticos no siempre son efectivos en el tratamiento de infecciones, debido a que las bacterias se hacen resistentes a los mismos. Sin embargo, los bacteriófagos sí pueden erradicarlas; además, en el caso de que se desarrollen bacterias resistentes a los mismos, pueden haber bacteriófagos que las afecten.
- Diversos bacteriófagos han demostrado mayor efectividad para el tratamiento de algunas infecciones en humanos frente al uso de antibióticos.
- El motivo por el cual el uso de bacteriófagos no está extendido es la dificultad de poder desarrollar fórmulas farmacéuticas sólidas; sin embargo, la selección de nuevos bacteriófagos contra las bacterias que se han hecho resistentes a los mismos es un proceso relativamente rápido. En cambio, el desarrollo de una fórmula farmacéutica para combatir bacterias resistentes a antibióticos puede suponer un trabajo de años (10).

3.4.4. Aplicaciones de bacteriófagos

A continuación aparecen algunas aplicaciones recientes de los bacteriófagos en el ámbito biomédico, utilizando como medios de liberación de bacteriófagos matrices o medio líquido.

3.4.4.1. Bacteriófagos incorporados en matrices

- K. Markoishvili [et al.] (2002) desarrollaron una matriz biodegradable de poliesteramida impregnada con bacteriófagos y combinada con un antibiótico para combatir infecciones en úlceras causadas por problemas vasculares. El tratamiento a base de antibióticos no era efectivo debido a la falta de riego sanguíneo, además cabía la posibilidad de que las bacterias se hicieran resistentes. En un 70% de los pacientes tratados, las úlceras se curaron completamente (15).
- G. Morris [et al.] (2001) desarrollaron un material biodegradable capaz de liberar tanto bacteriófagos como ciprofloxacina. Este material iba destinado al tratamiento de unas heridas infectadas por la bacteria *Staphylococcus aureus*, causadas a los pacientes por estar sometidos a altos niveles de radiación. Estas personas fueron tratadas con antibióticos pero la infección seguía manteniéndose; por ello, un mes más tarde fueron tratados con este tipo de material desarrollado. Las heridas pararon de supurar en un par de días, y la bacteria fue eliminada al cabo de una semana (16).
- H. A. Pearson [et al.] (2013) investigaron cómo enlazar covalentemente bacteriófagos a superficies poliméricas inertes manteniendo su actividad biológica. Los ensayos resultaron ser positivos, pues los bacteriófagos enlazados seguían manteniendo su actividad frente a bacterias como la *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* (17).

3.4.4.2. Bacteriófagos en medio líquido

- Universidad de California (2017) un paciente presentaba una infección bacteriana que era resistente al tratamiento con antibióticos. Como último recurso, se trató al paciente con un cóctel de bacteriófagos introducidos de manera intravenosa. El paciente despertó del coma inducido al cabo de 3 días de tratamiento sin presentar signos de infección (18).
- A. Villareal (2017) en España un paciente presentaba un orificio en el tórax por una infección de *Staphylococcus aureus* que mostraba resistencia al tratamiento con metilicina. Se trató al paciente con un vial de bacteriófagos, que consumió mediante vía oral a diario durante 20 días, hasta que finalmente la herida se pudo coser (19).

3.5 Protamina

3.5.1. Introducción

Las protaminas son un grupo diverso de pequeñas proteínas, ricas en el aminoácido arginina y que son sintetizadas en muchos animales y plantas. Se encuentran unidas al ADN empaquetando el genoma de los espermatozoides en un estado genéticamente inactivo. De forma natural es sintetizada en la última etapa de la espermatida de muchos animales y plantas, siendo su rol fisiológico la condensación del ADN. Si bien su estudio comienza en el año 1868 por Friedrich Miescher, desde entonces son muchos los trabajos que se han realizado para caracterizar a este conjunto de péptidos alifáticos, fuertemente básicos, de masa molecular aproximada entre los 4 - 10 kDa.

Los vertebrados tienen de uno a 15 genes de protamina por genoma haploide que se agrupan en el mismo cromosoma. Los elementos estructurales presentes en todas las protaminas verdaderas son una serie de dominios de anclaje de ADN ricos en arginina y múltiples puntos de fosforilación (20)(21).

Los estudios estructurales de las protaminas y sus complejos con el ADN se han limitado principalmente a la protamina del salmón. La espectroscopía ha demostrado que la protamina libre en disolución no está estructurada. Sin embargo, al unirse al ADN, la protamina se dispone alrededor de la hélice del ADN (*Figura 3.6*).

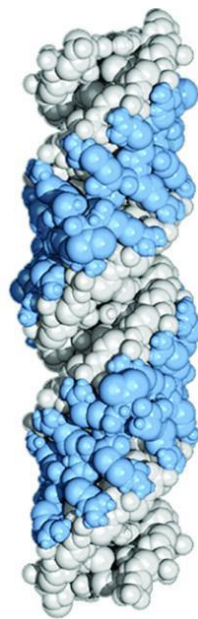


Figura 3.6. Modelo que muestra cómo dos moléculas de protamina de salmón adyacentes (átomos azules) se sitúan alrededor de la hélice del ADN (átomos blancos) y se unen dentro del surco ancho del ADN (20).

Aunque no se han obtenido todos los detalles estructurales del complejo ADN-protamina (todavía no se ha obtenido una estructura de resonancia magnética nuclear o cristalográfica de un complejo ADN-protamina), las interacciones predominantes que contribuyen a la notable estabilidad del complejo son la combinación de enlaces de hidrógeno y enlaces electrostáticos que se forman entre los grupos guanidinio

de cada residuo de arginina en los dominios de anclaje de la protamina y los grupos fosfato en ambas cadenas de ADN (20).

3.5.3. Funciones biológicas

Se han propuesto diferentes funciones para las protaminas, pero sólo una ha podido ser demostrada. Se ha demostrado que la síntesis y la deposición de protamina en la cromatina espermática se correlaciona con la compactación del genoma del espermatozoide y la terminación que acompaña la transcripción. La unión de la molécula de protamina al ADN neutraliza la carga negativa a lo largo del esqueleto fosfodiéster del ADN y permite que las moléculas de ADN adyacentes se junten. La inactivación de la mayoría de los genes del esperma abre el camino para la reprogramación del genoma masculino y la iniciación del desarrollo embrionario.

Aunque generalmente se acepta que la compactación de la cromatina espermática no juega un papel directo en la formación de la cabeza del espermatozoide, la unión de protamina al ADN da como resultado la producción de un complejo de cromatina sin carga que permite empaquetar las moléculas de ADN en un volumen de aproximadamente una vigésima parte de un núcleo somático. Esta compactación permite la producción de una cabeza más pequeña, más hidrodinámica, y contribuye indirectamente a la forma de la cabeza.

3.5.4. Aplicaciones

3.5.4.1. Liberación controlada de sustancias

Los estudios más recientes sobre las aplicaciones de la protamina están enfocados en el uso de la protamina como excipiente farmacéutico para la liberación controlada de drogas, de material genético (ADN, ARN y siARN) y otras aplicaciones en nanosistemas para la liberación de antígenos. Por ejemplo, una de las aplicaciones principales de la protamina es su uso al unirse con insulina para realizar una formulación de acción retardada. En particular los sistemas desarrollados se dividen en:

- Nanopartículas: sistemas de tipo matricial que se componen de un polisacárido como ácido hialurónico o alginato entrecruzado con protamina.
- Nanocápsulas: sistemas de tipo reservorio, constituidas por un núcleo líquido oleoso (Miglyol®, escualeno o α tocoferol) y una cubierta de protamina.

Dependiendo del tipo de estructura, se han asociado distintos antígenos modelo como son el antígeno recombinante de la hepatitis B y el antígeno de influenza H1N1. Los sistemas presentan una adecuada estabilidad en suspensión y en polvo seco a temperatura ambiente. Estudios in vitro han demostrado que ambos tipos de sistemas son eficazmente internalizados por células inmunocompetentes y estimulan la secreción de diversos tipos de citocinas. Estudios in vivo han demostrado la acción efectiva de los distintos nanosistemas con el antígeno asociado generando una respuesta inmune adecuada y prolongada. Por otra parte, se ha evaluado la posibilidad de que los diferentes sistemas sean formulaciones administradas libres de agujas, a través de la vía nasal, obteniendo respuestas inmunes protectoras frente al antígeno asociado y pudiendo modular el tipo de respuesta obtenida (humoral o celular), dependiendo de la vía de administración (21).

3.5.4.2. Anti-anticoagulante (anti-heparina)

La heparina no fraccionada sirve como terapia anticoagulante desde el inicio del intervencionismo coronario y sigue siendo, en la actualidad, el fármaco más utilizado, en parte gracias a su bajo coste y a su

facilidad de reversión. Sin embargo, hay inconvenientes asociados con su uso. Así, al tratarse de una preparación heterogénea de moléculas diferentes, se produce una variabilidad en su efecto, lo que conduce a la necesidad de controlarlo. El control de los efectos de la heparina y su reversión es posible mediante el suministro de protamina (PNH) (22).

3.5.4.3. Agente antimicrobiano

Otro campo de interés es su aplicación como agente antimicrobiano. La protamina es una molécula de origen biogénico que posee un amplio espectro antimicrobiano, tiene efecto inhibidor en un rango nanomolar y causa permeabilización de la membrana. Se supone que el efecto antimicrobiano de la protamina está causado por su naturaleza policatiónica. Un posible modo de acción puede consistir en su unión a la membrana externa, provocando un mal funcionamiento y la inducción de canales en la membrana, como se demostró para otros péptidos catiónicos. Se ha observado que su efecto sobre las bacterias gram-negativas es menor que en las bacterias gram-positivas.

Debido a su amplia gama de actividad contra organismos diana, ya se han sugerido preparaciones que contienen protamina para detergentes y composiciones de limpieza de superficies duras y en métodos para matar o inhibir células microbianas en crecimiento presentes en la ropa, en la piel humana o animal, mucosas, heridas, moretones o en el ojo, así como para la conservación de alimentos, bebidas, cosméticos, productos de lentes de contacto, ingredientes alimenticios o composiciones enzimáticas (23).

4. Materiales y métodos

4.1. Preparación de la disolución de PLA con protamina

El PLA utilizado para la fabricación de las fibras corresponde a un PLA de grado comercial (Natureworks®) con un contenido de 98 % w/w: del isómero L-láctico (PLA 4032D). De acuerdo a las características del fabricante, el PLA 4032D tiene una apariencia traslúcida, una densidad de 1,24 g/cm³. Sus propiedades calorimétricas y mecánicas corresponden a una temperatura de transición vítrea (T_g) de 70 °C, una temperatura de fusión (T_m) de 160 °C, un módulo de tensión (E) de 3440-3784 MPa y una fuerza de tensión (σ) de 103,2-144,5 MPa, y una elongación bajo tensión (γ) de 100-180%.

La protamina (PNH) es una proteína catiónica, la cual se ha obtenido del fabricante Sigma-Aldrich, que la obtiene a partir del esperma de salmón y la proporciona en forma de protamina sulfato. Según este proveedor presenta un peso molecular total de 5120 g/mol, siendo su peso molecular peptídico de 4250 g/mol. Su secuencia de aminoácidos es Pro-(Arg)₄-(Ser)₃-Arg-Pro-Val-(Arg)₅-Pro-Arg-Val-Ser-(Arg)₆-(Gly)₂-(Arg)₄. El proveedor reporta unas solubilidades de 10 mg/mL en agua o de 25 mg/mL en HCl 6 M.

Para poder obtener fibras mediante la técnica de electrospinning o electrohilado es necesario obtener una disolución del polímero de PLA que se encuentra en estado sólido. Las características de las disoluciones son de un 10% v/v de PLA, incorporando un volumen de 9,7 mL de una mezcla de cloroformo y acetona 2v/v, 200 µL de CH₃COOH y 100 µL de HCl. En todos los casos se ha utilizado cloroformo para análisis estabilizado con amileno, acetona de alto grado para análisis de HPLC, HCl y CH₃COOH para análisis. Además estas disoluciones podrán incorporar un peso de protamina de 10 a 20 mg, lo que representará un peso teórico de entre 1 y 2 %. La protamina será disuelta previamente en el medio ácido de 300 µL de CH₃COOH y HCl, y mezclada con una disolución de PLA ya completamente disuelta.

Para preparar los viales de 10 mL se ha seguido el siguiente procedimiento:

- 1) Preparación del solvente a utilizar de Cloroformo:Acetona (2v:v).
- 2) Introducir 1 g de PLA dentro del vial.
- 3) Introducir con la ayuda de una pipeta de precisión 9,7 mL de disolución Cloroformo/Acetona dentro del vial.
- 4) Cerrar el vial, sellándolo con parafilm y mantenerlo dentro de la incubadora durante 24h a 37°C y 100 rpm.
- 5) Si se pretende trabajar con una matriz de PLA con PNH, se debe disolver previamente la cantidad de 10 a 20 mg de PNH con 200 µL de CH₃COOH y 100 µL de HCl de análisis. Seguidamente añadir a la solución de 9,7 mL de PLA ya disuelta y mezclar de manera exhaustiva con la ayuda de un vórtex. En caso de trabajar con una matriz de PLA sin PNH, se procederá de la misma manera, mezclando la disolución ácida pero sin haber disuelto la PNH en el medio.

4.2. Electrospinning

Para llevar a cabo la acumulación de matrices mediante la técnica de electrospinning (*Figura 4.1*) se han utilizado los siguientes componentes:

- Bomba de desplazamiento
- Jeringa de plástico BD de 10 mL
- Aguja capilar 18G para jeringa, de 1,2 mm de diámetro y de punta roma
- Fuente de alimentación de alto voltaje
- Superficie colectora

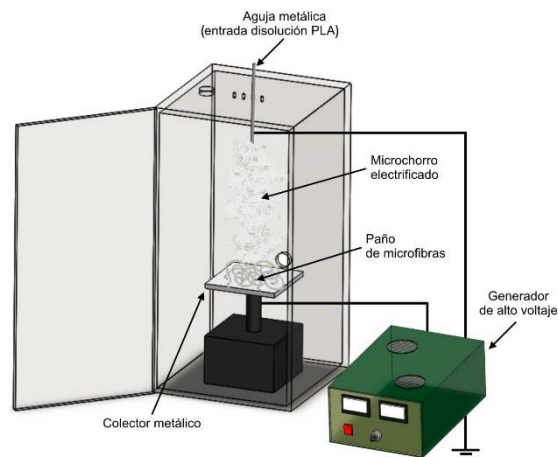


Figura 4.1. Esquema del equipo de electrohilado (no incluye unidad de bombeo y jeringa). El solvente queda evaporado durante la electrificación, siendo recogidas la microfibras de PLA sobre el colector metálico.

Además de este material, se han utilizado portaobjetos y cubreobjetos para analizar las muestras in-situ mediante el microscopio óptico.

El procedimiento llevado a cabo en el electrospinning ha sido el siguiente:

- 1) Carga de la jeringa con la solución correspondiente de PLA (previamente bien agitada en el vórtex).
- 2) Sujeción de la jeringa en la bomba en posición vertical.
- 3) Recubrimiento de la superficie colectora con papel de aluminio.
- 4) Conectar el polo negativo de la fuente de alimentación a la punta de la jeringa y el positivo al colector.
- 5) Encender y programar las características de trabajo de la bomba: Tipo y tamaño de jeringa, volumen de disolución, y flujo de trabajo.
- 6) Definir una distancia de trabajo entre la aguja y el colector metálico en nuestro caso, de 12 cm.
- 7) Dar inicio al generador de voltaje definiendo un voltaje de trabajo de entre 15 y 18 kV, y seguidamente dar inicio a la bomba. Esperar que caigan las primeras gotas de disolución polimérica y dejar acumular.

8) Para tomar muestras de fibras, se debe detener la bomba y después el generador de voltaje de manera momentánea, y se debe situar un cubreobjetos sobre el papel de aluminio. Se vuelve a encender fuente de voltaje y bomba, y se dejan acumular microfibras sobre el cubreobjetos durante 10 segundos.

9) Observar las fibras recogidas con el microscopio óptico. Si las fibras se presentan lineales mantener el voltaje de trabajo. De lo contrario, ajustar las condiciones de voltaje. Normalmente el voltaje de trabajo se encuentra entre 15 y 16 kV, aunque puede ser necesario trabajar hasta 18 kV si se observan microfibras poco lineales o con defectos. Otro indicador de estar trabajando con poco voltaje, sería el hecho de observar que caen gotas de la disolución sobre la matriz que se está obteniendo, debido a que el solvente de cloroformo/acetona no se evapora.

4.3. Caracterización de las matrices de PLA: Morfología y diámetro de las fibras.

Para llevar a cabo la caracterización de las fibras se han utilizado métodos microscópicos. De manera in-situ se han valorado las fibras con el microscopio óptico (MO) Zeiss Axioskop 40, para definir unas condiciones de trabajo óptimas durante el electrohilado. Por otra parte se ha analizado la porosidad y diámetro de fibras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

4.3.1. Microscopía óptica (MO)

El microscopio óptico Carl Zeiss Standar 20, se ha utilizado para observar las muestras recogidas en el cubreobjetos obtenidas mediante la técnica del electrospinning.

Un microscopio óptico consta de un sistema de iluminación regulable, un sistema óptico que aumenta el tamaño de la imagen de la muestra y un sistema mecánico mediante el cual se consigue graduar el enfoque de la imagen aumentada.

El microscopio óptico se sirve de la luz visible para formar una imagen aumentada de la muestra mediante un sistema de lentes. Si se mira a través del ocular se observa una imagen virtual aumentada respecto de la imagen real.

Para el ES es una herramienta indispensable, porque la evaluación de las fibras obtenidas de manera rápida (in situ) permite tomar decisiones para cambiar los parámetros operacionales del proceso.

4.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM), permite analizar la morfología de la superficie de la fibra a mayor aumento que el MO. Se ha utilizado el equipo Focus Ion BeamZeiss Neon40 (*Figura 4.2*).

La técnica del SEM se basa en la reproducción de una imagen mediante el uso de electrones. La cámara donde se introduce la muestra trabaja al vacío. En la parte superior de la cámara está situado el cañón de electrones el cual produce un haz de electrones que viaja verticalmente a través del microscopio a un voltaje de aceleración de 5 kV, generando posteriormente la imagen. La muestra es enfocada gracias a una serie de lentes electromagnéticas situadas en la columna. Los electrones de alta intensidad inciden sobre la muestra y los electrones dispersados de alta intensidad son captados por detectores que los convierten en una señal digital captada por una pantalla.

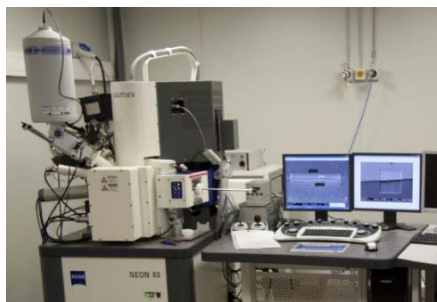


Figura 4.2. Imagen general del equipo de microscopía electrónica: Focus Ion BeamZeiss Neon40.

Para que la técnica del SEM se pueda aplicar sobre el material es necesario que la muestra sea conductora. En el caso de que no sea conductora se le debe hacer un tratamiento previo, que consiste en recubrir la muestra con una capa delgada de material conductor (oro o carbono). Este recubrimiento se ha realizado con carbono con el dispositivo Mitec K950 SputterCoater, el cual crea un recubrimiento por pulverización catódica utilizando un campo eléctrico y nitrógeno gas, trabajando en condiciones de vacío.

El procedimiento que se ha llevado a cabo para analizar una muestra en el SEM es:

- 1) La muestra a analizar se coloca sobre el portamuestras del SEM.
- 2) Recubrir con carbón la muestra mediante el dispositivo Mitec K950 SputterCoater.
- 3) Introducir la muestra conductora en la precámara del SEM con la ayuda de un brazo metálico.
- 4) Cerrar la precámara y aplicarle el vacío.
- 5) Abrir la compuerta de la precámara y depositar, con la ayuda del brazo, el portaobjetos con las muestras en la plataforma de la cámara.
- 6) Extraer el brazo, cerrar la compuerta. El interior de la cámara del SEM se puede observar a través del ordenador ya que se reproduce la imagen. Elegir la muestra a analizar con la ayuda del programa informático.
- 7) Tomar fotografías con el programa Smart Tiff de Carl Zeiss SMT Ltd.

Las fotos obtenidas mediante el SEM son aptas para analizar la morfología de la fibra y para tomar medidas de diámetros y realizar así su distribución. Las medidas de diámetro se realizan con el mismo programa informático y mediante el programa Origin Pro 8.0 el procesamiento de los datos.

4.4. Ángulos de Contacto

El equipo que se ha utilizado para medir los ángulos de contacto es el DataPhysics OCA 15plus (*Figura 4.3*) y el software es el SCA20. El valor del ángulo obtenido sirve para comprobar si la superficie de la muestra es hidrofílica o hidrofóbica.



Figura 4.3. Imagen general del equipo DataPhysics OCA 15plus.

El análisis de ángulos de contacto es una técnica superficial y para su medición se emplea el análisis de la forma de la gota aceptando que la gota es una forma simétrica respecto a un eje vertical y teniendo en cuenta que las únicas fuerzas que afectan a la forma de la gota son la tensión superficial y la gravedad. Los ángulos se miden ajustando una expresión matemática a la forma de la gota, calculando el ángulo entre la recta tangente de la gota y la base de referencia (*Figura 4.4*).

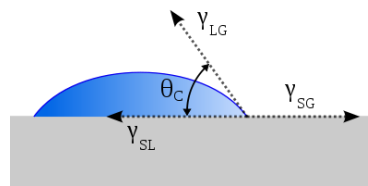


Figura 4.4. Esquema geométrico del ángulo de contacto de una gota.

El procedimiento utilizado para medir los ángulos de contacto ha sido el siguiente:

- 1) Cargar la jeringa de vidrio Hamilton de 500 μL con el solvente, en este caso agua.
- 2) Colocar la jeringa en el equipo.
- 3) Introducir en el programa los datos relativos al fluido utilizado, tipo y tamaño de jeringa y el volumen de gota de 0,5 μL a dispensar.
- 4) Colocar la muestra sobre una superficie metálica y fijarla para que quede plana, colocar la superficie en la base del equipo.
- 5) Con la ayuda de la cámara observar por la pantalla la muestra y la jeringa. Dispensar una gota.
- 6) Observando por la pantalla, subir la superficie metálica hasta que se toque con la gota y después separarla de manera que la gota quede sostenida encima de la muestra.
- 7) Con la ayuda del programa aplicar la línea base y medir el ángulo.

4.5. Espectrómetro IR

El equipo que se ha utilizado ha sido el FTIR 4100 Jasco con los accesorios Specacmodel MKII Golden Gate Heated Single Reflection Diamond ATR y con ZnS lenses + High Stability Temperature Controller (West 6100+) (Figura 4.5). Este permite realizar un estudio cualitativo para determinar los grupos funcionales que constituyen la muestra, tanto sólida como líquida.



Figura 4.5. Imagen general del equipo FTIR 4100 Jasco.

La espectrometría del IR se basa en la absorción de radiación infrarroja a una determinada longitud de onda a partir de la excitación de los modos de vibración y subestados de rotación de las moléculas que provocan un cambio en su momento dipolar. Es posible asignar absorciones a grupos funcionales específicos y obtener un espectro de IR diferente para cada molécula.

El procedimiento que se ha llevado a cabo para la realización del espectro de las diferentes muestras ha sido el siguiente:

- 1) Encender el ordenador y poner en marcha el espectrofotómetro siguiendo las instrucciones del aparato.
- 2) Abrir el ATR como se indica las instrucciones y limpiar con etanol el soporte de diamante y el cristal de zafiro
- 3) Hacer una línea base (background).
- 4) Poner la muestra entre el soporte y el cristal y cerrar el ATR. Tomar la medida del espectro utilizando el programa informático Spectra-measurement. Guardar el espectro.
- 5) Repetir el procedimiento a partir del punto 5, para cada muestra.
- 6) Cerrar el equipo siguiendo las instrucciones.

4.6. Análisis térmico: Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA)

4.6.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

Es un análisis donde se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura, o bien en función del tiempo. En el primer caso (experimento dinámico) la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada (normalmente de forma lineal con el tiempo), y en el segundo (experimento isoterma), la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica. Existen otros tipos de análisis denominados termogravimetría diferencial donde se registra o representa la variación de masa o derivada con respecto a la temperatura o respecto al tiempo dependiendo de que el experimento sea dinámico o isoterma respectivamente.

4.6.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido DSC es una técnica que consiste en el análisis de la evolución del flujo de calor intercambiado entre la muestra y la referencia (inerte) en función de la temperatura (o del tiempo) mientras se aplican rampas térmicas, observando y cuantificando las diferentes transiciones energéticas que puede sufrir un material, ya sea por calentamiento o enfriamiento, con o sin cambio de fase o bien por reacción química.

Se inyecta nitrógeno gaseoso en el sistema para crear una atmósfera controlada y disminuir la humedad del ambiente en la atmósfera de trabajo, así como para atenuar los efectos de condensación. Con esta técnica es posible determinar las temperaturas de transiciones de fase (temperatura de transición vítrea, temperatura de cristalización y temperatura de fusión) y reacciones químicas de diferentes materiales, así como el flujo de calor asociado, sea exotérmico o endotérmico.

4.7. Cuantificación de la protamina en las matrices de PLA

Para el estudio de la PNH presente en las matrices de PLA se ha procedido con las técnicas de Espectroscopía ultravioleta y Electroforesis. Mediante electroforesis es posible determinar de manera cualitativa la presencia de PNH en las fibras, mientras que la espectroscopía ultravioleta hace posible la valoración de la concentración de PNH. El objetivo del estudio ultravioleta-visible será la determinación cuantitativa de mg de PNH en las fibras de PLA, a partir de la obtención de una recta de calibración de la absorbancia del enlace peptídico de la protamina a 230 nm.

4.7.1. Espectroscopía ultravioleta

El equipo utilizado para el estudio de espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS) ha sido el espectrofotómetro modelo UV-3600 de la marca Shimadzu controlado por el software UVProbe 2.31. (Figura 4.6). Se trata de un equipo de doble haz, el cual opera con una cubeta de referencia y otra cubeta en la que se realiza la medida sustrayendo el valor de la referencia.



Figura 4.6. Imagen general del equipo UV-3600 (Shimadzu).

La técnica se basa en la absorción de energía en una longitud de onda determinada, dentro de los rangos de luz ultravioleta (190 a 350 nm) y visible del espectro electromagnético (350 a 780 nm). De la absorción selectiva de la radiación resulta un espectro que proporciona información fundamental para la determinación de las propiedades del material, estructura y composición química.

Para obtener medidas de una concentración conocida de PNH, se ha trabajado a partir de un patrón de 10 mg PNH/mL en agua. A partir de una cubeta con 1000 μL de agua Milli-Q, se ha añadido progresivamente un determinado volumen del patrón dentro de la cubeta, homogenizando la mezcla, y se ha realizado la lectura. Todas las lecturas servirán para establecer un modelo matemático con la obtención de una recta de calibrado de la concentración de protamina con UV a la absorbancia de 230 nm.

El procedimiento para trabajar con el equipo ha sido el siguiente:

- 1) Encender ordenador y equipo, esperando un tiempo de 15 a 30 minutos para conseguir que las lámparas emitan una energía constante.
- 2) Abrir el programa UVProbe-Spectrum e introducir las condiciones en las que queremos trabajar.
- 3) Realizar el autocero sin cubetas en el interior del equipo.
- 4) Realizar una línea base con las dos cubetas llenas de nuestro solvente (agua Milli-Q). Enseguida se recoge un espectro que corresponde a una línea continua constante con valor 0 de absorbancia.
- 5) A continuación, la cubeta posterior se deja como referencia para la medida de la absorbancia en las muestras.
- 6) Colocar la muestra y medir la absorbancia, asegurándose que el equipo queda bien cerrado.
- 7) Guardar los resultados en el servidor y apagar el equipo.

4.7.2. Curva de calibrado

La curva de calibración es un método muy utilizado en química analítica para determinar la concentración de una sustancia en una muestra desconocida, sobre todo en disoluciones. El método se basa en la relación proporcional entre la concentración y una determinada señal analítica. Conociendo esta relación, será posible conocer la concentración en una muestra dada mediante la medida de esa señal. La relación entre la concentración y señal se suele representar en una gráfica a la que se le conoce como curva de calibración o curva de calibrado.

Es imprescindible que la señal analítica utilizada mantenga una relación proporcional con la concentración. Las señales más utilizadas son aquellas cuya relación con la concentración es lineal, al menos en el rango de trabajo. Por ejemplo, una de las propiedades más utilizadas es la absorbancia (absorción lumínica) que suele mantener una relación lineal con la concentración de solutos en disoluciones dentro de un determinado rango de concentraciones. Al ser una relación lineal, se puede representar mediante una recta, de ahí que este tipo específico de curva de calibración se conozca también como recta de calibración.

4.7.3. Electroforesis

Mediante el ensayo con la técnica de electroforesis, es posible la valoración cualitativa de substancias como la PNH. Las proteínas poseen carga eléctrica, y cuando son sometidas a un campo eléctrico se desplazan a una velocidad que dependerá de la densidad de carga y de la fricción con el medio. Los objetivos del ensayo mediante electroforesis han sido:

- La determinación cualitativa de la incorporación de protamina en la fibra.
- Verificación de la interacción fago – protamina, puesto que el conjunto presentaría diferencia de carga neta y tamaño, y por tanto diferente movilidad electroforética respecto a la protamina libre.

Los ensayos se han llevado a cabo a partir de un gel de poliacrilamida en posición vertical, de 10 pocillos (Figura 4.7).



Figura 4.7. Gel montado en la cubeta de electroforesis.

Para montar la estructura que dará forma al gel de poliacrilamida se han utilizado los materiales de la *Figura 4.8*, donde aparecen dos placas de vidrio de medida 8 x 11 cm, tres pinzas, dos separadores de 1.5 mm y una goma del mismo grosor. Se necesitará además un peine con 10 dientes de 1,5 mm para originar los 10 pocillos del gel donde se cargarán las muestras.

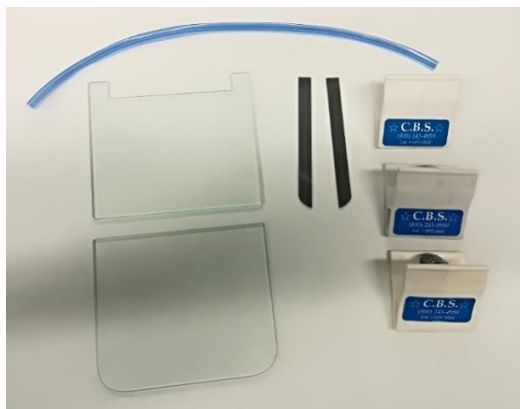


Figura 4.8. Imagen del material utilizado para el montaje del molde del gel.

Una vez la estructura para el molde ya está preparada, se procede a la obtención del gel de poliacrilamida. Los reactivos utilizados para la elaboración de un gel con el 15% de acrilamida han sido los siguientes:

- Acrilamida 30% / bisacrilamida 0,2%
- Ácido acético 43%
- Tiourea
- Urea
- Peróxido de hidrogeno 30%
- Agua Milli-Q

El procedimiento para formar un gel de 12 mL ha sido el siguiente:

- 1) Pesar 0.0105 g tiourea y 1.8018 g de urea dentro de un recipiente tipo Falcon.
- 2) Añadir 6 mL de la disolución de acrilamida y 1.5 mL de ácido acético 43 %.
- 3) Mezclar invirtiendo el Falcon suavemente, sin hacer burbujas, hasta que la solución quede disuelta.
- 4) Enrasar en probeta con agua Milli-Q hasta los 12 mL, volver a mezclar y devolver al Falcon.
- 5) Añadir 67,5 μL de H_2O_2 30% a la disolución, mezclar suavemente y rápidamente, antes de que se produzca la polimerización, verter el contenido dentro del molde previamente preparado, situando sobre la parte superior los dientes del peine de 1.5 mm que darán forma a los 10 pocillos.
- 6) Una vez el gel está polimerizado, se puede situar el conjunto en la cubeta (*Figura 4.7*). La cubeta permite trabajar con 2 geles a la vez. En el caso de únicamente trabajar con un gel, se deberá situar en el lado

opuesto de la cubeta un cristal de tope, que servirá para contener el medio conductor (ácido acético al 5%). Llenar con el acético la parte inferior de la cubeta, fijar el gel en la misma con las 2 pinzas (*Figura 4.7*) y finalmente llenar también la parte superior de la cubeta con acético 5%.

7) Se retira el peine de manera cuidadosa y verticalmente, conservando así la forma de los pocillos.

8) Con una jeringa Hamilton de 100 μ L, cargar cada muestra dentro de su correspondiente pocillo. Cada muestra contendrá un volumen de tampón de muestras GPAU 2X (*Tabla 1*) para gel de acético/urea.

9) Conectar los polos negativos y positivos de la fuente de voltaje con la cubeta. En nuestro caso, en el cual se ensaya con una molécula de carga positiva como la PNH, el avance será hacia el polo negativo, por tanto, el polo positivo quedará situado en la parte superior y el negativo en la inferior de la cubeta.

10) Iniciar la electroforesis, ajustando el voltaje de la fuente de alimentación a 130 V. El ensayo dura aproximadamente 2 horas.

11) Antes de que el marcador verde de metilo, que sirve de referente de avance, haya alcanzado la parte inferior del gel se detiene la corriente.

12) Se desmonta el molde cuidadosamente, extrayendo el gel y colocándolo dentro un recipiente con disolución de tinción GPAU durante un mínimo de 1 h o hasta el día siguiente. Pasado este tiempo, se sustituye la solución de tinción por la de destinción y se deja en agitación (renovándola si es necesario) hasta que sea posible distinguir y observar las distintas bandas de las muestras en el gel.

13) Dejar secar el gel entre dos hojas de celofán mojado para su conservación permanente.

| | Tampón de muestras GPAU 2x | Teñidor Comassie Blue GPAU | Desteñidor GPAU |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|
| 2- β -mercaptoetanol (μ L) | 14 | - | - |
| Urea (g) | 4,8 | - | - |
| Ácido acético (mL) | 0,5 | - | - |
| Verde de metilo 1% | Punta de espátula | - | - |
| Agua (mL) | Enrasar | 500 | 500 |
| Metanol (mL) | - | 500 | 500 |
| 0,25 % Comassie Blue R-250 (g) | - | 2,75 | - |
| Ácido acético glacial (mL) | - | 100 | 100 |
| Volumen Total (mL) | 10 | 1100 | 1100 |

Tabla 1. Composición del tampón de muestras y soluciones de tinción/destinción de geles de poliacrilamida-acético-urea (GPAU).

4.8. Ensayos biológicos

Para proceder a la carga de bacteriófagos dentro de las matrices poliméricas se ha realizado el ensayo mediante la adsorción de matriz con disolución de bacteriófagos. A continuación se explican las diferentes preparaciones llevadas a cabo para realizar el estudio con bacteriófagos, trabajando con cultivos de *Staphylococcus aureus* y con placas de agar.

4.8.1. Preparación de matrices de PLA con bacteriófagos.

Para llevar a cabo la carga con bacteriófagos, se procede a trabajar con un preparado comercial de Fersisi (Figura 4.9). El vial comercial de Fersisi presenta un vial de 5 mL de solución de bacteriófagos, siendo una solución de aspecto amarillo oscuro, y con una concentración según el fabricante de 10^7 fagos/mL, los cuales son un cóctel de diferentes tipos de fagos, en los cuales también están presentes fagos específicos contra *S. aureus*.



Figura 4.9. Imagen del bote comercial de Fersisi.

Se ha procedido a cargar los fagos por adsorción sobre la superficie de la matriz de PLA, siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- 1) Tomando una matriz, ya sea de PLA y/o de PLA con PNH, se recortan muestras cuadradas de cada una, con un tamaño de 1 cm^2 , se pesan y se deposita cada muestra en un Eppendorf y se esteriliza la matriz y el tubo sometiéndolo a radiación V durante un mínimo de 5 minutos.
- 2) Preparar dos diluciones de 1:2 de los bacteriófagos, mezclando 10 mL de solución comercial de bacteriófagos con 10 mL de PBS (phosphate buffered saline) estéril.
- 3) Se añaden 100 μL /mg matriz de la disolución de 1:2 de bacteriófagos en cada Eppendorf con su respectiva matriz.
- 4) Con la ayuda de un agitador vórtex, se asegura que todas las matrices quedan totalmente cubiertas por la solución de bacteriófagos, dejando cada muestra en agitación durante hasta el día siguiente a 37°C a 100 rpm.

- 5) Se recogen las muestras del agitador y se dejan reposar 5 minutos. Seguidamente se les extrae el sobrenadante con la ayuda de una pipeta.
- 6) Se resuspenden con 1 mL de agua estéril, centrifugándose a 1000g durante 5 minutos.
- 7) Se vuelve a extraer todo el volumen añadido de agua.
- 8) Realizar un pequeño orificio en la tapa de cada Eppendorf y dejar todas las muestras dentro del congelador (-80°C) durante 24h. Este orificio permitirá la salida de vapor de agua cuando se realice la sublimación.
- 9) Se procede a la liofilización de las muestras con el equipo Hucoa- Erlöss (Figura 4.10)



Figura 4.10. Imagen del equipo Hucoa- Erlöss.

Se enciende el equipo y se espera a que se refrigere hasta una temperatura de -60°C. Una vez alcanzada la temperatura, se inicia el vacío y se espera que se alcancen entre 60 – 100 mTorr. Finalmente se conecta el envase que contiene las muestras al equipo, dejando el equipo trabajando la sublimación durante 24h.

Pasado este tiempo, se recupera cada muestra, tapando los orificios que se realizaron anteriormente con la ayuda de Parafilm, y conservando las muestras en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente.

4.8.2. Preparación del cultivo de bacterias

El cultivo a preparar será a partir de la especie *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 25923, bacteria susceptible a ser eliminada con el bacteriófago Fersisi.

Para proceder a la preparación del cultivo, se siguen los siguientes pasos:

- 1) Primeramente se debe preparar el medio líquido LB Broth, con una proporción de 25 g/litro, utilizando 12,5 g LB Broth con 0,5 L de agua destilada.
- 2) Una vez disuelto, se debe esterilizar (filtración de 0,22 µm con la ayuda de una bomba).

3) El cultivo bacteriano se ha iniciado a partir de un cultivo previo de *S. aureus*. Para refrescar el cultivo se mezclan 0,5 mL ON del cultivo antiguo con 10 mL de caldo LB. La mezcla de volúmenes se debe realizar asépticamente con pipetas con puntas procedentes de autoclave y dentro de una campana que haya sido esterilizada con radiación ultravioleta (*Figura 4.11*) durante al menos 15 min.

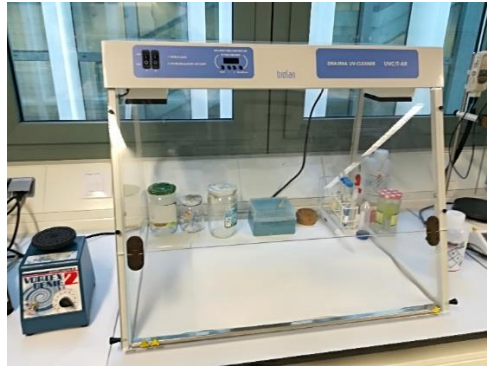


Figura 4.11. Imagen de la campana con radiación ultravioleta.

4.8.3. Lectura y cuantificación de bacterias

Para evaluar la actividad bacteriana de manera cuantitativa se procederá al cálculo del número de bacterias a partir del equipo lector de microplacas EZ-READ 400 ELISA (*Figura 4.12*).



Figura 4.12. Imagen del lector de microplacas EZ-READ 400 ELISA.

Para realizar la lectura en el equipo Elisa se han llevado a cabo los siguientes pasos:

1. Agitar en el vortex el tubo con la disolución de las bacterias *S. aureus*.
2. Poner 100 μ L de cada muestra en placas de poliestireno de 96 pocillos.
3. Se pone en un lector Elisa, para realizar la lectura de absorbancia a 595nm como medida para determinar la cantidad de bacterias.

4. Partiendo de la base que $1 \text{ OD} = 10^8$ bacterias/mL, mediante la absorbancia se calcula el número aproximado de bacterias.

4.8.4. Ensayo cualitativo de bacteriófagos

Para proceder a un análisis más cualitativo de la eficacia de los bacteriófagos sobre la bacteria *S. aureus* se realiza un ensayo de cultivo sobre placas. Estas placas contienen un medio con nutrientes como peptonas de caseína, vitaminas B, oligoelementos y minerales. Estos nutrientes son necesarios para el crecimiento bacteriano. El ensayo se realizará utilizando cultivo joven de *S. aureus* que, durante el crecimiento bacteriano en las placas, formará colonias por toda la superficie, como se puede comprobar en la *Figura 4.13*, donde aparecen las colonias como puntos redondos blanquecinos. Al tratarse de un ensayo cualitativo, será posible comparar el crecimiento de las bacterias de manera visual valorando la densidad de colonias formadas (24) (25).

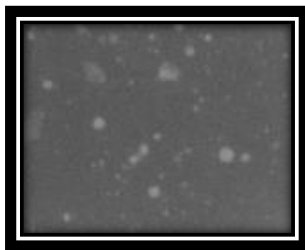


Figura 4.13. Ejemplo de crecimiento en colonias de la especie *S. aureus*.

Se han llevado a cabo dos tipos diferentes de ensayo con placas, donde se observará la aparición de calvas o bien de halos. La observación de calvas es posible a partir de bacteriófagos repartidos de forma homogénea por el volumen de la placa, de manera que se observan huecos sin presencia de colonias.

Por otra parte, la apreciación de halos es posible debido a la acción localizada de bacteriófagos en algún punto de la superficie de la placa, observándose una zona con ausencia de colonias alrededor del lugar donde había presencia de bacteriófagos. En la *Figura 4.14* es posible observar un ejemplo de la aparición de calvas y halos sobre una superficie de colonias de *S. aureus*.

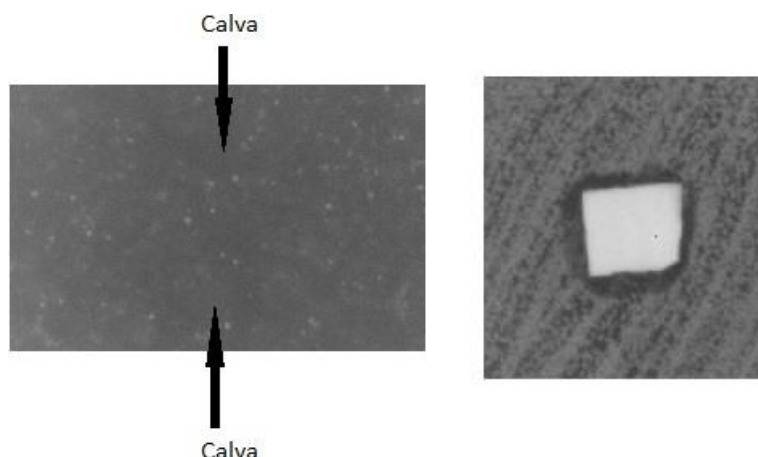


Figura 4.14. Ejemplo de calvas y de un halo formado por una matriz con bacteriófagos sobre la superficie de una placa de cultivo de la especie *S. aureus*.

4.8.4.1. Inhibición del crecimiento bacteriano: Observación de calvas

Durante este ensayo, se homogenizan los bacteriófagos con el cultivo de bacterias por toda la superficie y volumen de la placa. Se ha seguido el siguiente procedimiento:

- 1) Calentar el recipiente que contiene LB con agar 6% al “baño maria” a una temperatura de 60°C, en la cual se produce la licuación.
- 2) Preparar en tubos de ensayo diluciones de 1:10, 1:1000 de bacteriófagos en 1 mL de medio de LB. Añadir 1 mL de cultivo *S. aureus*.
- 4) Preparar paralelamente un control de cultivo sin bacteriófagos.
- 5) Dejar los tubos de ensayo en la incubadora durante 90 min a 100 rpm y 37°C.
- 6) Añadir aproximadamente 10 mL de LB con el agar 6% ya licuado en cada tubo de ensayo, y seguidamente verter el contenido de cada tubos en una placa BHI (Brain & Hearth Infusion).
- 7) Una vez gelificado el agar, incubar las placas durante a 37°C.
- 8) Observar si se han producido calvas.

4.8.4.2. Inhibición del crecimiento bacteriano: Observación de halos

Este ensayo permite la observación de halos sobre un cultivo bacteriano en placa a partir de la acción de bacteriófagos. Procedentes de matrices de PLA cargadas con bacteriófagos y depositadas sobre la superficie de la placa. Asimismo se ha procedido a ensayar con un volumen de PNH para comprobar su efecto antiséptico. El procedimiento a seguir es el siguiente:

- 1) A partir de un cultivo de *S. aureus*, se siembra la superficie de la placa de LB y con la ayuda de un bastoncillo de algodón estéril. Es importante distribuir homogéneamente las bacterias sobre la placa. Con este punto se tiene una placa que puede servir como control de cultivo. Sembrar tantas placas como pruebas se quieran realizar.

- 2) En el caso de trabajar con una matriz de PLA (con o sin bacteriófagos adsorbidos), colocar la matriz sobre la superficie de la placa de LB. Aplanar la matriz, de forma que quede toda en contacto con la superficie.
- 3) Como control, se debe usar placas sembradas donde se añade un volumen de 5 μL de bacteriófagos o PNH en un punto localizado de la superficie de la placa, esperar hasta que el volumen quede totalmente absorbido.
- 4) Incubar todas las placas a 37°C.
- 5) Observar si se han producido halos.

5. Resultados y discusión

5.1. Preparación PLA-Protamina

5.1.1. Disolución de PLA

Todas las disoluciones de PLA con PNH que se han preparado para obtener las microfibras han sido de un volumen de 10 mL, presentando una concentración del PLA del 10% w/v, donde el PLA siempre ha sido disuelto con una mezcla de cloroformo/acetona de relación de volumen 2v:1v. Aproximadamente estas disoluciones tardan 24 horas en disolverse completamente, en agitación de 120 rpm a 37°C. Estas características se han mantenido para preparar todas las disoluciones de PLA, por tanto son unas condiciones estándar que no se han variado.

5.1.2. Pruebas de solubilidad de protamina

Para llevar a cabo la incorporación de la protamina en las disoluciones de PLA, era necesario la previa disolución de PNH, utilizando disolventes que facilitaran la solubilidad y que no dañaran o hidrataran posteriormente las disoluciones de PLA y que fueron compatibles con la técnica del electrospinning (ES).

Se han llevado a cabo pruebas de solubilidad con los disolventes que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Prueba de solubilidad: disolventes, volúmenes y pesos de PNH.

| Disolvente | Peso PNH (mg) | Volumen disolvente (mL) | Solubilidad |
|----------------------------|---------------|-------------------------|-------------|
| Cloroformo:Acetona 2v:1v | 20,5 | 3 | No soluble |
| Cloroformo | 19,1 | 2 | No soluble |
| Acetonitrilo | 16,8 | 2 | No soluble |
| DMSO | 18,6 | 2 | Parcial |
| DMSO + HCOOH | 5,7 | 1 + 0,2 | Parcial |
| CH ₃ COOH + HCl | 5,7 | 0,2 + 0,1 | Total |

Los disolventes como cloroformo, cloroformo:acetona y acetonitrilo fueron descartados ya que eran incapaces de disolver la protamina. En otros disolventes se comprobó que había cierta solubilidad de PNH, como en el caso del DMSO. En este caso, y para intentar aumentar la solubilidad de la PNH, se procedió a realizar una mezcla de DMSO con HCOOH que también mostró una solubilidad parcial de PNH.

Del mismo modo, se procedió a intentar la disolución de PNH con una mezcla de 0,2 mL de ácido acético y 0,1 mL de HCl, mostrando una solubilidad más eficaz que la anterior combinación.

Finalmente, quedaba comprobar el comportamiento de las disoluciones de PLA al incorporar estos disolventes mediante ensayos con ES. Debido a la mayor solubilidad de la mezcla con HCl y CH_3COOH , este modelo fue el escogido para obtener las microfibras de PLA-PNH. Al añadir PNH disuelta en 200 μL de ácido acético y 100 μL de HCl a la disolución de PLA, durante el ES se detectaron algunas anomalías, ya que era posible observar pequeñas irregularidades durante la acumulación de fibras sobre el colector. El cono de Taylor en algunos instantes no era continuo, presentando las fibras un aspecto de telaraña. Pese a esta observación, una vez se consumía toda la disolución de PLA, se obtenían unas matrices de aspecto normal. Además se probaron de disolver mayores cantidades de PNH, mantenido el mismo volumen de CH_3COOH y HCl, resultando una completa solubilidad para cantidades de 10 a 20 mg de PNH, siendo después incorporadas en disoluciones de PLA.

Debido a estos resultados se decidió establecer que todas las disoluciones de PLA, respetando la relación de 10% peso/volumen de las disoluciones de PLA, se prepararían disolviendo el PLA con 9,7 mL de Cloroformo/Acetona 2v:1v y añadiendo al PLA ya disuelto, 200 μL de CH_3COOH y 100 μL de HCl con cantidades de PNH de 10 a 20 mg. Además para mantener las mismas condiciones en todas las microfibras, estas cantidades de CH_3COOH y HCl se añadieron también a las disoluciones de PLA que no incorporarían PNH.

5.2. Características físicas de las microfibras de PLA

5.2.1. Diámetro y morfología de las fibras

Las matrices de fibras de PLA-PNH obtenidas por ES fueron preparadas en las siguientes condiciones operacionales: distancia aguja-colector de 12 cm, flujo de disolución de 10 mL/h a través de una aguja 18G de punta roma, y voltaje optimizado en el rango de 16-18 kV. El ES fue realizado en posición vertical y las fibras recogidas sobre un colector estático.

Las fibras se han analizado mediante imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de 3 matrices de PLA con diferentes cantidades de PNH. La nomenclatura para denominar las muestras será PLA-PNH-N°, donde N° indica el porcentaje aproximado de protamina. En general, todas las imágenes de las muestras a menor aumento permiten observar que las fibras están distribuidas al azar, presentando una morfología cilíndrica y rectilínea. A mayor aumento es posible apreciar que la mayoría de las fibras son de carácter liso (*Figura 5.1*).

Para caracterizar las muestras se han realizado más de 100 lecturas de los diámetros de las microfibras de cada muestra. En general se ha podido observar que el tamaño del diámetro se ajusta a una distribución de modelo Gaussiano (*Figura 5.1*).

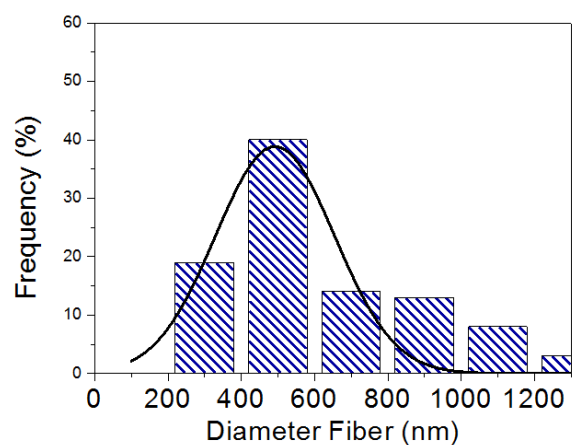
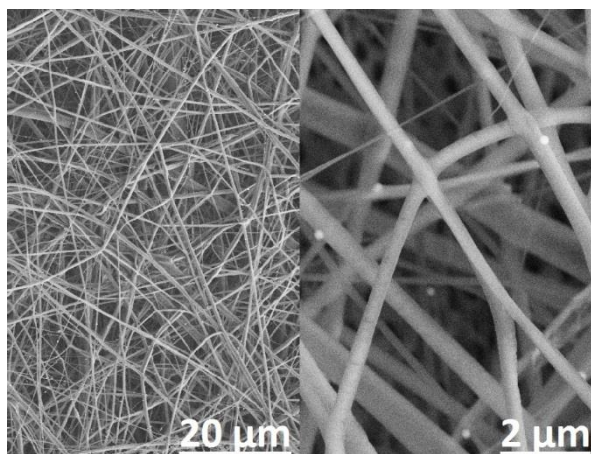
La estadística descriptiva para las medidas de los diámetros se resume en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Condiciones de ES y diámetros de las fibras de PLA cargadas con PNH. Valores extremos del intervalo de confianza al 95%.

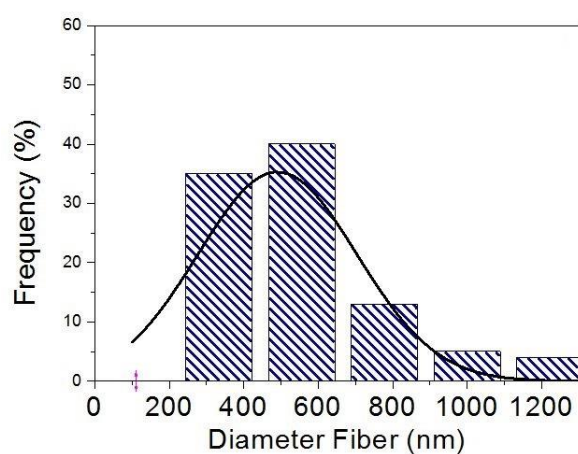
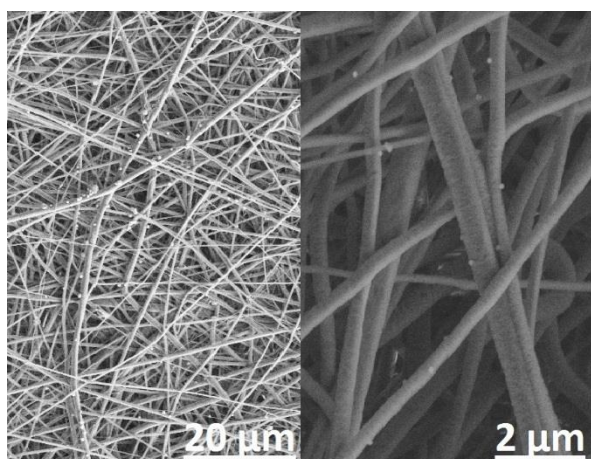
| Muestra | Peso Protamina sulfato (mg) | Voltaje Electrohilado(kV) | Diámetro (nm) Promedio \pm SE (nm) | IC-95% Lower (nm) | IC-95% Upper (nm) |
|-----------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|
| PLA-PNH-0 | 0 | 16 | 651 \pm 33 | 585,52665 | 716,46735 |
| PLA-PNH-1 | 10 | 16 | 596 \pm 30 | 537,13809 | 655,34791 |
| PLA-PNH-2 | 21,4 | 18 | 540 \pm 20 | 500,4122 | 579,87889 |

Observando los resultados de la *Tabla 3* y la *Figura 5.1*, las muestras presentan diámetros promedios algo dispares entre ellos, pese a que las microfibras estudiadas solo se diferencian en el porcentaje de PNH que contienen y ligeramente en el voltaje de trabajo durante el ES.

PLA - PNH - 0



PLA - PNH - 1



PLA - PNH - 2

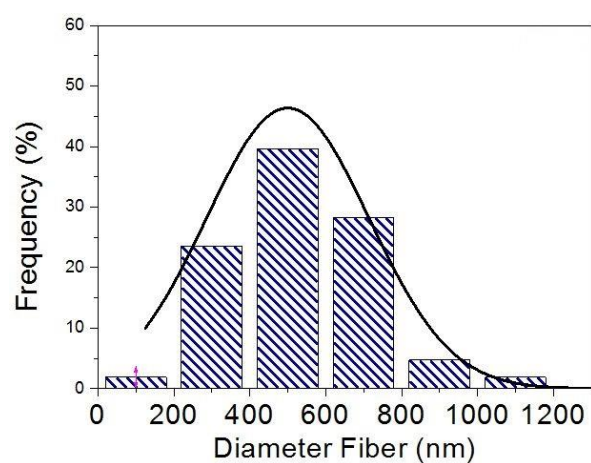
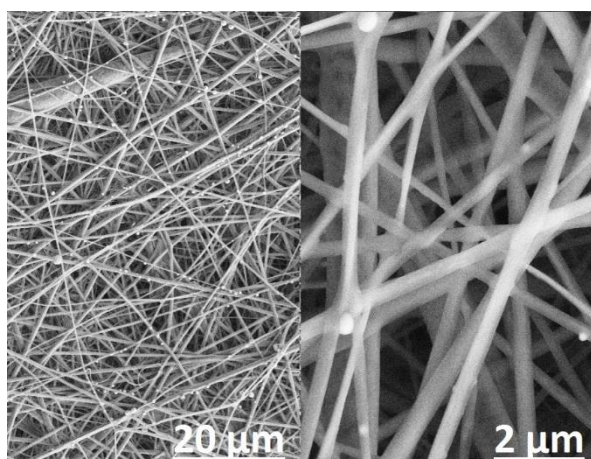


Figura 5.1. Imágenes SEM para el estudio de la morfología de las matrices y microfibras. Se muestra un gráfico con la distribución de frecuencia de los diámetros de las microfibras.

La muestra PLA-PNH-0 es la única que no presenta PNH, y presenta un diámetro promedio superior a las muestras PLA-PNH-1 y PLA-PNH-2, que sí presentan PNH. Analizando los diámetros en función del porcentaje de PNH se puede observar que hay correlación con la cantidad de PNH presente en el PLA con el diámetro de microfibras obtenido (Figura 5.2). A mayor porcentaje de PNH en las microfibras, menor diámetro de fibras.

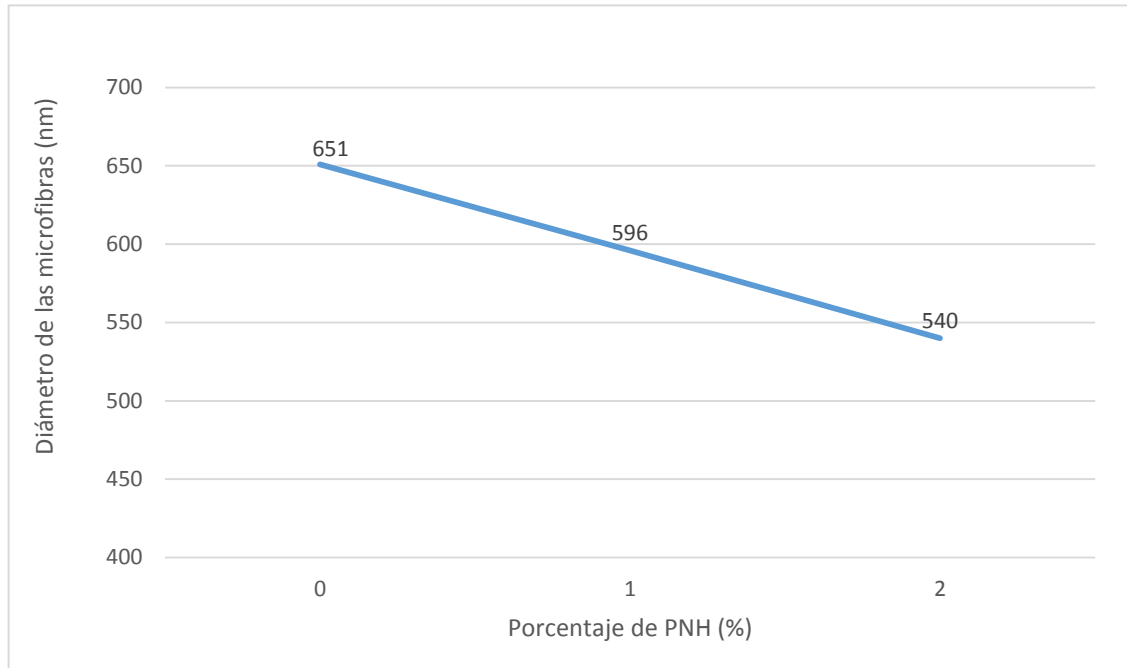


Figura 5.2. Diámetro de las microfibras de PLA – PNH.

5.2.2. Ángulos de contacto

El análisis de los ángulos de contacto permite determinar la hidrofobicidad de la superficie de las matrices de microfibras. Se puede observar la imagen de una gota de agua sobre la muestra de PLA-PNH en la Figura 5.3.

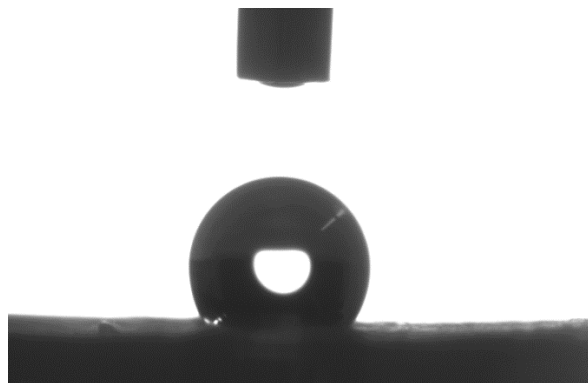


Figura 5.3. Imagen de una gota de agua sobre la superficie de una muestra de PLA-PNH.

Se ha estudiado la superficie de las mismas muestras que el apartado anterior; PLA-PNH-0, PLA-PNH-1 y PLA-PNH-2. Se pueden comprobar los resultados en la *Figura 5.3* y la *Tabla 4*. Se han realizado más de 20 medidas de los ángulos de contacto.

Tabla 4. Valores medios, SE y extremos de confianza del 95%.

| | Media (°) | SE of mean | Lower 95% CI of Mean | Upper 95% CI of Mean |
|-----------|-----------|------------|----------------------|----------------------|
| PLA-PNH-0 | 133,67941 | 1,14924 | 131,30202 | 136,0568 |
| PLA-PNH-1 | 132,67952 | 1,50542 | 129,56533 | 135,79371 |
| PLA-PNH-2 | 120,74067 | 1,38342 | 117,87885 | 123,6025 |

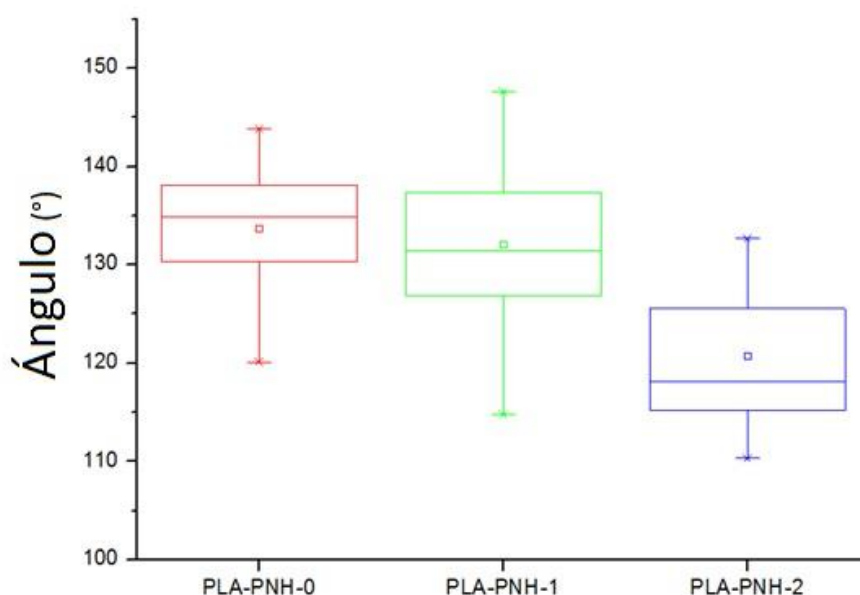


Figura 5.3. Ángulos de contacto promedio sobre superficies de PLA/PNH.

Los resultados muestran en todos los casos que las fibras son hidrofóbicas (Todos los ángulos son mayores a 90 °). Esto es debido a la naturaleza del PLA que es hidrofóbico.

Por otra parte se puede comprobar una disminución en el ángulo de contacto al incrementar el porcentaje de PNH en las fibras. Estos resultados muestran que al incorporar PNH a las microfibras de PLA, se obtiene una superficie más hidrofílica. Se trata de un resultado lógico, ya que la PNH es una sustancia polar, y al estar presente en las fibras de PLA, se produce mayor afinidad del solvente de agua, reduciendo la hidrofobicidad.

5.2.3. Análisis FTIR del PLA, PLA-Protamina y Protamina

Se ha mostrado que el PLA procesado por ES incrementa su cristalinidad. La espectroscopía FTIR puede dar información sobre la conformación y cristalinidad, aunque su interpretación en el caso del PLA es difícil debido a sus diferentes conformaciones moleculares y empaquetamiento. Sin embargo, se pueden realizar algunas observaciones.

La absorbancia de la banda del carbonilo alrededor de 1757 cm^{-1} tiene poca correlación con los cambios conformacionales de la cadena principal. Por este motivo esta banda puede ser usada como una banda de referencia para corregir las fluctuaciones debido a las diferencias en el espesor de las matrices.

Las intensidades relativas entre las bandas 1382 cm^{-1} ($\delta s(\text{CH}_3)$) y 1092 cm^{-1} (vas (C-O-C)) cambian bajo el annealing de las muestras (p.e., cuando se incrementa la cristalinidad). Finalmente, la banda de absorción a 921 cm^{-1} es característica de la forma- α y corresponde al esqueleto C-C con estiramiento del CH_3 . Por otra parte, la protamina muestra una banda flexión entre las longitudes de onda 1640 y 1550 cm^{-1} , debido a la presencia de aminas primarias y secundarias.

Se estudiaron 4 muestras distintas: una grana de PLA cristalino, una muestra de microfibras de PLA y otra de PLA-PNH obtenidas con ES, y una muestra de protamina sulfato. Los resultados de la *Figura 5.4* muestran que el FTIR no tiene la suficiente sensibilidad para identificar la presencia de protamina en las muestras de PLA.

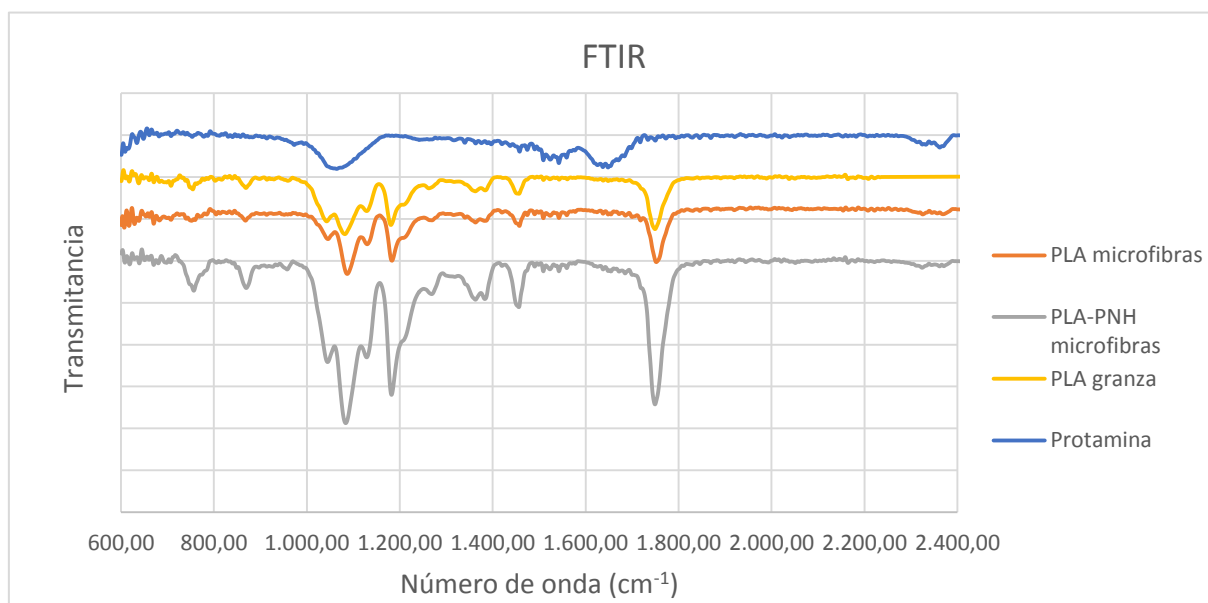


Figura 5.4. Espectros FTIR (en la región $2400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) de microfibras de PLA y PLA-PNH, PLA cristalino y PNH.

5.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA)

El comportamiento térmico de las matrices de fibras de PLA y PLA/PNH fueron estudiadas por termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Este estudio fue realizado con la muestra de PLA/PNH-2, es decir con la máxima carga de PNH para poder evidenciar los cambios térmicos.

La degradación térmica de las matrices estudiada por TGA muestra claramente que las matrices de PLA y PLA/PNH tienen un único proceso de transición térmica y sus pesos residuales fueron 1,58% y 3,05%, respectivamente. Este ligero residuo mayor en la matriz de PLA/PNH puede ser explicado desde que la muestra de PNH sola muestra una gran cantidad de residuo (27,36%) al final de su degradación térmica que ocurre mostrando hasta 3 transiciones térmicas (*Figura 5.5.a*). En este sentido, el análisis de la derivada de la TGA (DTGA) muestra para la muestra de PNH una transición térmica mayoritaria a la temperatura de 302,53°C. Esta transición es muy diferente a las obtenidas para las matrices de PLA (362,02°C) y PLA/PNH (359,96°C). Sin embargo, esta pequeña diferencia de aproximadamente 2°C entre las matrices de PLA y PLA/PNH puede ser explicada por la presencia de PNH en la matriz PLA/PNH (*Figura 5.5.b*). Finalmente, se debe destacar la distribución homogénea de PNH en la matriz de PLA/PNH, lo cual es evidente por el pico único observado en el análisis de la DTGA (*Figura 5.5.b*).

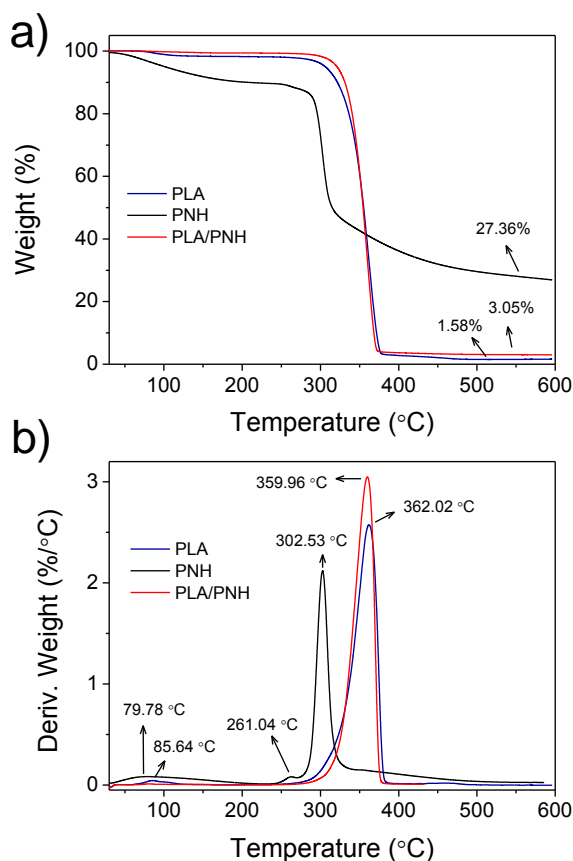


Figura 5.5. Degradación térmica de las matrices de PLA y PLA/PNH-2 obtenidas por electrospinning. Curvas de TGA (a) y DTGA (b).

El estudio calorimétrico de DSC en las muestras de las matrices de fibras fue realizado de manera cíclica: las muestras fueron calentadas (primer calentamiento) seguidas de un enfriamiento, y nuevamente se volvieron a calentar (segundo calentamiento). Este segundo calentamiento permite analizar las transiciones térmicas desde el borrado térmico de las muestras. En las *Figuras 5.6.a* y *5.6.b* se muestran

los resultados de DSC obtenidos para las matrices de PLA y PLA/PNH, respectivamente. De estos resultados lo primero que destaca son las claras diferencias entre las transiciones térmicas observadas durante el primero y segundo calentamiento. Para la matriz de PLA durante el primer calentamiento (*Figura 5.6.a*) se observa que el área del pico de cristalización (36,71 J/g) fue similar al área del pico de fusión (39,24 J/g) lo cual evidencia el alto grado de cristalinidad y orden molecular debido a la naturaleza cristalina de la muestra de PLA y al procesamiento por electrospinning que contribuye al incremento del orden molecular en las fibras de PLA. Esto es claramente evidenciado en el segundo calentamiento de la muestra de matriz de PLA cuando se observa que la T_g disminuye a 64,12°C, y el pico de la cristalización ocurre a 136,56°C con un área de 10,47 J/g. Esta entalpía fue menor en 6 J/g con respecto al valor de la entalpía de fusión (16,48 J/g). Estos resultados claramente evidencian la importancia del proceso de cristalización en frío del PLA durante el electrospinning.

Por otro lado, el comportamiento térmico de la matriz de PLA/PNH fue diferente que la matriz de PLA. En la *Figura 5.6.b* se observa que las temperaturas de cristalización y fusión para la matriz de PLA/PNH, tanto para el primer y segundo calentamiento fueron menores en comparación a la matriz de PLA (*Figura 5.6.a*). Sin embargo, en ambas matrices las temperaturas de la T_g muestran los mismos cambios durante el primer y segundo calentamiento. En particular durante el primer calentamiento, la menor temperatura de cristalización (87,82°C) de la matriz de PLA/PNH indicaría un mayor componente amorfo en esta matriz. Esto mismo se puede deducir de la diferencia entre las entalpías de fusión y cristalización que corresponde a 6,43 J/g (para la matriz de PLA fue de solo 2,53 J/g). La presencia de un aumento de la fracción amorfa en la matriz de PLA/PNH también se observa en el segundo calentamiento, donde no solo la temperatura de cristalización es menor (122,29°C) sino también la entalpía de cristalización fue mayor (19,70 J/g) en comparación a la matriz de PLA (10,47 J/g).

Finalmente, destaca en la matriz de PLA/PNH que la diferencia entre la entalpía de fusión del primer y segundo calentamiento sea muy pequeña (3,51 J/g) con respecto a lo que sucede en la matriz de PLA (22,76 J/g). Una explicación para estas diferencias correspondería a que la fusión de la PNH contribuye a la fusión de la matriz PLA/PNH, pero la fusión de PNH ocurre a temperatura de 114,11°C (*Figura 5.6.c*) y corresponde a más de 50°C por debajo de la temperatura de fusión de la matriz PLA/PNH. Aunque el pico de fusión de PNH es muy amplio su baja concentración en la matriz puede resultar poco contributivo, además el segundo calentamiento de PNH no muestra ninguna transición térmica (*Figura 5.6.c*). En este sentido, la mejor explicación para las transiciones térmicas encontradas en la matriz de PLA/PNH sería que la presencia de PNH sirve como centros de nucleación para la cristalización del PLA y produce un mayor ordenamiento de las cadenas de PLA en las matrices de fibras PLA/PNH.

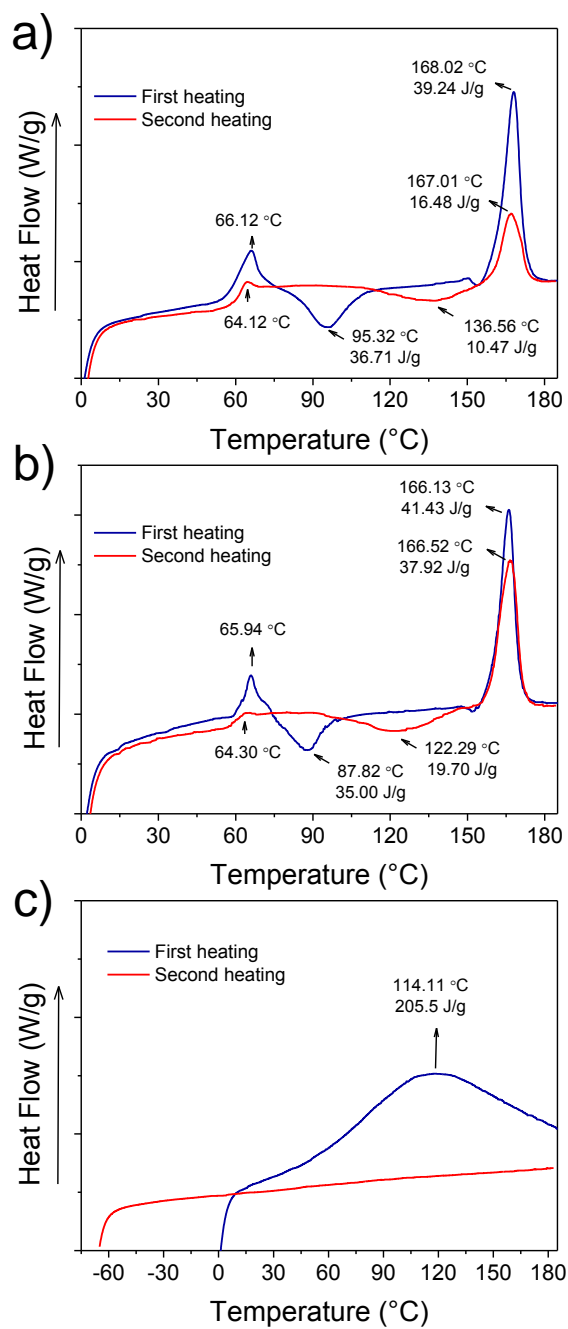


Figura 5.6. Ciclos de calentamiento durante el DSC de las matrices de fibras de PLA (a) y PLA/PNH (b). DSC de PNH (c).

5.2.5. Determinación de la protamina en la matriz

5.2.5.1. Extracción de la protamina de las microfibras de PLA

Para poder valorar la PNH de las muestras de PLA y que sean estudiadas mediante ensayos de electroforesis o por espectroscopía ultravioleta/visible, era necesario encontrar una forma que permitiera extraer la máxima PNH posible de las matrices de PLA.

Para realizar la extracción de la PNH contenida en las microfibras de PLA, se ha ensayado con agua Milli-Q y HCl 0,4 M. Se ha seguido el siguiente procedimiento para ambos casos:

- 1) Disolver las matrices con aproximadamente 200 μL de cloroformo en un Eppendorf agitando con un vórtex. Si no se disuelve al completo, se añade progresivamente de 100 μL en 100 μL hasta que la matriz quede disuelta.
- 2) Añadir 1 mL de agua Milli-Q o HCl 0,4 M, mezclar con vórtex y centrifugar a 12000 rpm durante 3 minutos.
- 3) Extraer el sobrenadante y guardarlo como muestra.

En los siguientes apartados se verá el efecto que supone la extracción con HCl frente a la extracción con agua.

5.2.5.2. Determinación de protamina mediante electroforesis

Mediante el ensayo por electroforesis se han evaluado muestras de matriz de PLA con PNH.

A partir de una disolución de PNH de 1 mg/mL, el gel ha sido cargado con diferentes volúmenes, que sirven como patrón para determinar la presencia de protamina en las muestras, ya que acaban mostrando unas bandas que pueden ser comparables con las bandas de la PNH extraída de las matrices de PLA-PNH. Los volúmenes de patrón que se han preparado han sido los siguientes (*Tabla 3*):

Tabla 5. Volumen de patrones preparados para electroforesis.

| Vol. Patrón 1 mg/mL (μL) | Vol. H ₂ O (μL) | Vol. TM GPAU 2x (μL) | Vol. Total (μL) |
|---------------------------------------|---|-----------------------------------|------------------------------|
| 1 | 9 | 10 | 20 |
| 2 | 8 | 10 | 20 |
| 5 | 5 | 10 | 20 |
| 10 | 0 | 10 | 20 |

Se han estudiado 4 muestras de una matriz de PLA con un 1,73% en peso de PNH (2,08% de protamina sulfato). Se han realizado las extracciones de la PNH de las muestras, dos con agua y dos con HCl, por tal de comprobar cuál de los dos disolventes era más idóneo para la extracción de PNH. Los volúmenes utilizados para las muestras de PLA-PNH han sido 12 μ L de la muestra extraída en 1 mL de agua o HCl, con 12 μ L del tampón de muestras GPAU. En la *Figura 5.7* se puede observar el resultado de las diferentes bandas, donde cada letra representa:

| | |
|--------------------------------|---|
| A: Patrón de 1 μ g de PNH | E: 30,5 mg Matriz de PLA extraída en H ₂ O |
| B: Patrón de 2 μ g de PNH | F: 12,9 mg Matriz de PLA extraída en H ₂ O |
| C: Patrón de 5 μ g de PNH | G: 44,2 mg Matriz de PLA extraída en HCl 0,4 M |
| D: Patrón de 10 μ g de PNH | H: 33,8 mg Matriz de PLA extraída en HCl 0,4 M |

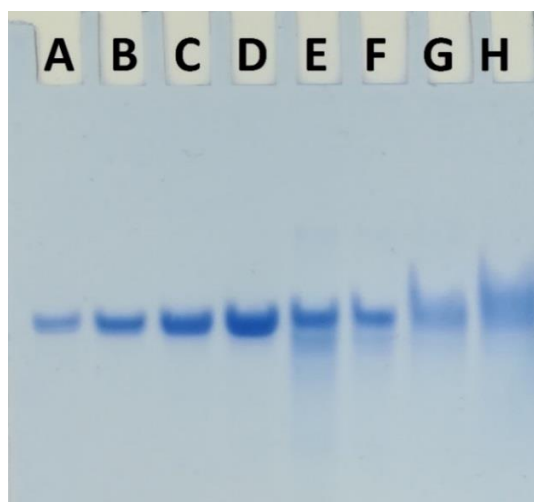


Figura 5.7. Gel de electroforesis para la determinación de PNH. Patrones de PNH: A) 1 μ g, B) 2 μ g, C) 5 μ g, D) 10 μ g. PNH extraída en agua desde la matriz de PLA: E) 30,5 mg de matriz, F) 12,9 mg de matriz. PNH extraída en HCl 0,4 M desde la matriz de PLA: E) 44,2 mg de matriz, F) 33,8 mg de matriz.

Comparando las diferentes bandas obtenidas (*Figura 5.7*), se puede observar la semejanza de intensidad entre las bandas B y C (patrones de 2 y 5 μ g de PNH) con las bandas provenientes de matrices E y F, lo cual denota que la concentración de PNH de las muestras se encuentra entre 0,17 y 0,42 mg PNH/mL (2 y 5 μ g disueltos en 12 μ L). Por tanto, además de determinar la presencia de PNH en las muestras, es posible valorar semicuantitativamente la concentración de PNH de las muestras.

Por otra parte, la PNH proveniente de matriz que ha sido extraída con HCl presenta unas bandas que han migrado anómalamente durante la electroforesis, originando bandas difusas y difíciles de valorar. En cualquier caso, la cantidad de protamina extraída no es superior a la extraída con H₂O. Por esta razón se procedió rutinariamente a la extracción de la protamina de las fibras con agua.

5.2.5.3. Cuantificación de la protamina en las microfibras de PLA

Obtención de la curva de calibrado

A partir de una disolución patrón de 10 mg PNH/mL, se han preparado diferentes diluciones del patrón, obteniendo la absorbancia de los enlaces peptídicos presentes en la PNH a 230 nm. En la *Figura 5.8* es posible observar la recta de calibración obtenida. Esta recta permitirá más adelante la cuantificación de la PNH en cualquier muestra. Durante los cálculos se ha tenido en cuenta el peso real de protamina del bote comercial de protamina sulfato, donde el porcentaje en peso de protamina es del 83%.

La Ecuación 1 muestra la relación matemática obtenida entre la absorbancia y la concentración de PNH.

$$\text{Absorbancia} = 0,9573 * [\text{Protamina}]$$

Ecuación 1. Ecuación de la recta de calibrado.

También es importante tener en cuenta el valor de la R^2 , el cual hace referencia a la precisión de las muestras observadas. En este caso, el valor de la R^2 de la recta obtenida es óptimo ($R^2=0,9975$) teniendo en cuenta que el ideal es $R^2=1$. Este resultado refleja que el experimento ha salido correctamente.

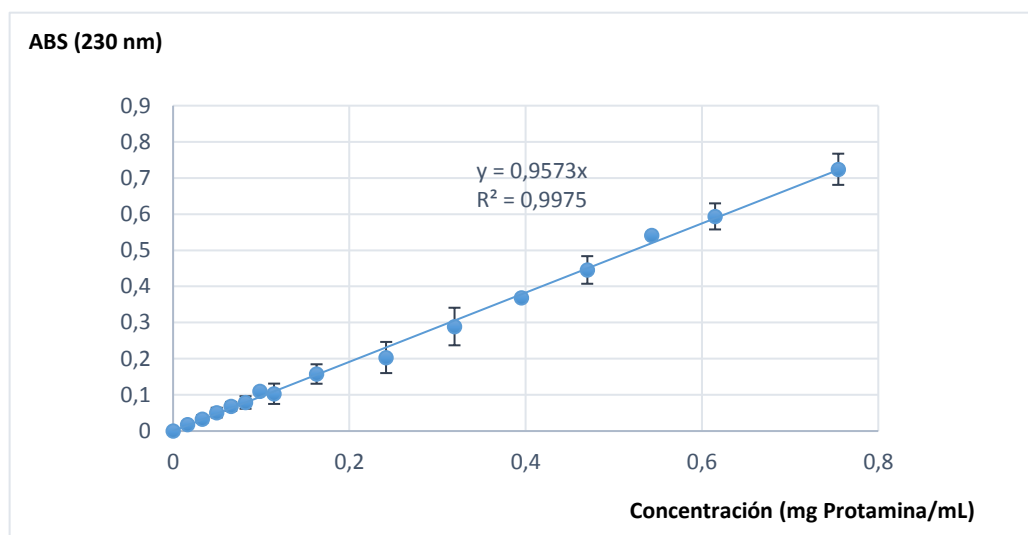


Figura 5.8. Recta de calibración entre absorbancia y concentración de PNH.

Cuantificación de la protamina en las muestras de PLA

A partir de la obtención de la recta de calibrado es posible determinar de forma cuantitativa la PNH extraída de las fibras. Para ello se ha medido la absorbancia a 230 nm del enlace peptídico de la protamina contenida en las matrices de PLA-PNH. Para realizar los cálculos de la manera más rigurosa posible, se han tenido en cuenta los siguientes variables:

- La absorbancia a 230 nm de la línea base.
- La absorbancia a 230 nm correspondiente a un blanco de matriz de PLA sin PNH.

Por tanto, para calcular la absorbancia real de la PNH de la muestra estudiada se tiene en cuenta la *Ecuación 2*:

$$Abs\ PNH = Abs\ Muestra - \frac{Abs\ Blanco}{mg\ Matriz\ Blanco} \times mg\ Matriz - Abs\ Línea\ Base$$

Ecuación 2. Ecuación de la absorbancia real de PNH en una muestra de PLA.

Por tanto, una vez obtenida la absorbancia de una muestra, a partir de la *Ecuación 3*, se ha calculado el porcentaje en peso de PNH en la matriz.

$$\% \frac{mg\ PNH}{mg\ Matriz} = \frac{\frac{Abs\ PNH}{0,9573} \times Factor\ de\ Dilución \times V\ Muestra}{mg\ Matriz}$$

Ecuación 3. Ecuación de porcentaje en peso de PNH en una matriz de PLA.

Se evaluaron 3 matrices de PLA con distintas cantidades de PNH, analizando una muestra control sin PNH y 2 muestras con PNH. Las características de las matrices se encuentran en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Pesos y porcentajes teóricos de PLA-PNH de las muestras analizadas. El peso de PNH ha sido calculado a partir del porcentaje en peso de protamina del 83% del bote comercial de protamina sulfato.

| Matriz | Peso PLA (g) | Peso de Protamina sulfato (mg) | Peso PNH (mg) | %PNH/PLA Teórico |
|-----------|--------------|--------------------------------|---------------|------------------|
| PLA-PNH-0 | 0,9968 | 0 | 0 | 0 |
| PLA-PNH-1 | 1,0021 | 10 | 8,3 | 0,82 |
| PLA-PNH-2 | 1,026 | 21,4 | 17,76 | 1,73 |

Se ha estudiado la absorbancia de las muestras de PLA-PNH, con la ayuda del equipo de espectroscopía ultravioleta-visible, para finalmente cuantificar el porcentaje real de PNH en peso de las diferentes muestras. Los resultados se resumen en la *Tabla 8*.

Comparando la *Tabla 7* y *Tabla 8*, se puede comprobar que los resultados obtenidos de porcentaje en peso de PNH por miligramo de matriz se aproximan a las fracciones teóricas.

Tabla 8. Pesos y porcentajes de PLA-PNH calculados de las muestras analizadas.

| Matriz | Peso Muestra (mg) | Abs PNH 230 nm | [PNH] mg/mL | PNH (mg) | %PNH/Matriz | Media %PNH/PLA | Desviación |
|-----------|-------------------|----------------|-------------|----------|-------------|----------------|------------|
| PLA-PNH-0 | 52,6 | 0,0002 | 0,00019 | 0,001 | 0,002 | 0,0018 | - |
| PLA-PNH-1 | 20,5 | 0,021 | 0,109 | 0,109 | 0,532 | 0,58 | 0,065 |
| | 48,9 | 0,058 | 0,306 | 0,306 | 0,625 | | |
| PLA-PNH-2 | 30,5 | 0,101 | 0,528 | 0,528 | 1,73 | 1,95 | 0,31 |
| | 12,9 | 0,053 | 0,279 | 0,279 | 2,16 | | |

Por otra parte, estos valores calculados deberían tender a ser inferiores a los teóricos, ya que como máximo el valor que se puede alcanzar es el teórico, es decir, no debería haber más PNH de la que se ha añadido, sobre todo si se tiene en cuenta que para la preparación de las muestras, explicado en el apartado 5.2.5.1, se han disuelto las matrices de PLA con cloroformo y agua Milli-Q, y se han centrifugado, y por tanto puede ser que no se haya podido recuperar toda la PNH.

Observando la muestras, en el caso del PLA-PNH-1 resulta inferior su valor al teórico de PNH, pero no es el mismo caso para la matrices de PLA-PNH-2, donde una de las muestras ha resultado ligeramente superior al valor teórico. Esto puede ser debido a que no hay total homogeneidad de PNH en las matrices de PLA, y consecuentemente hay zonas con mayor acumulación de PNH. Por tanto, más que un error en el modelo de cuantificación, es más un error experimental debido a la viscosidad del PLA disuelto, el cual puede dificultar la homogenización de la PNH. Estos resultados estarían indicando que la operación de mezclado de las disoluciones de PLA y la disolución de PNH debe ser realizada de manera exhaustiva antes de realizar la conformación de las fibras por ES.

5.3. Interacción protamina – bacteriófagos

En este ensayo se pretende demostrar mediante electroforesis la atracción electrostática de los bacteriófagos, que presentan una carga negativa, frente a la PNH, que es una proteína con carga positiva.

Se estudiarán diferentes volúmenes de bacteriófagos Fersisi de dilución 1:2 en PBS con un volumen de PNH de concentración 1 mg/mL. Para ello se han valorado 6 muestras, con las composiciones que se muestran en la *Tabla 9*.

Tabla 9. Volúmenes de las muestras estudiadas en electroforesis para el ensayo interacción PNH-bacteriófagos

| Muestra | PNH 1 mg/mL (μg) | Fersisi (μL) | PBS(μL) | GPAU (μL) | Vol. Total (μL) |
|---------|------------------|--------------|---------|-----------|-----------------|
| 1 | 2 | - | 10 | 12 | 24 |
| 2 | 2 | - | 10 | 12 | 24 |
| 3 | 2 | 4 | 8 | 12 | 24 |
| 4 | 2 | 10 | 6 | 12 | 24 |
| 5 | - | 4 | - | 12 | 24 |
| 6 | - | - | 12 | 12 | 24 |

Todas las muestras están numeradas conforme la posición que se encuentran en los pocillos del gel de electroforesis:

- Muestras 1 y 2: Controles de PNH.
- Muestras 3 y 4: Dos volúmenes diferentes de Fersisi con PNH.
- Muestra 5: Control de bacteriófago Fersisi en ausencia de PNH.
- Muestra 6: Control del medio PBS.

Cabe destacar que previamente al ensayo todas las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a excepción de la muestra 2.

Tras iniciar el ensayo de electroforesis a un voltaje constante de 130 V durante 2 horas, se obtuvieron en el gel los resultados de la *Figura 5.9*:

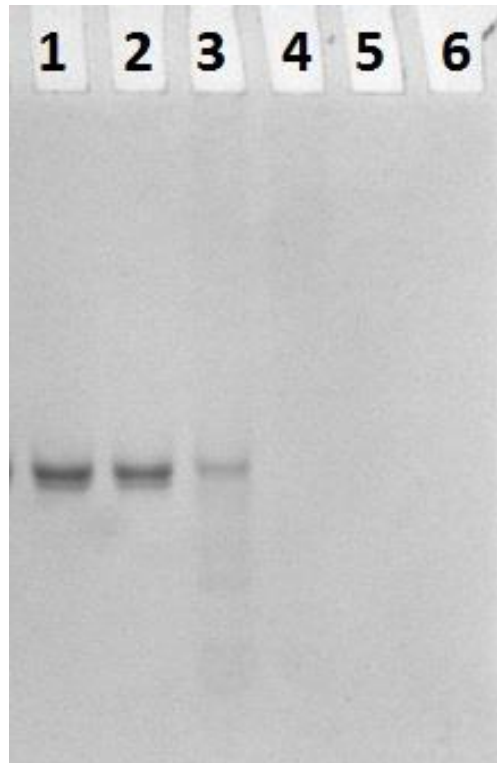


Figura 5.9. Imagen del gel resultante tras la electroforesis. En la parte superior, figura el número de cada muestra.

Es posible observar que todas las muestras de control tanto de bacteriófagos como de PBS no muestran ningún tipo de banda.

El resultado más significativo se da en las bandas 3 y 4 de Fersisi con PNH. Es posible observar en la muestra 3 que pese a contener la misma proporción de PNH que en los controles de protamina (muestras 1 y 2), presenta una banda más tenue, manifestando así que la PNH ha interactuado con los bacteriófagos de Fersisi. De hecho, la muestra 4 es prácticamente imperceptible visualmente, hecho lógico ya que contenía mayor concentración de fagos, neutralizando la carga positiva de los 2 μg de PNH.

De este modo, el experimento se puede considerar un éxito ya que se ha logrado demostrar que los bacteriófagos interactúan por fuerzas electroestáticas con la PNH, y por tanto este hecho favorece la adsorción de los fagos en las matrices de PLA-PNH.

5.4. Ensayos biológicos

5.4.1. Cultivos en placas agar: Observación de calvas

Mediante el ensayo de observación de calvas será posible valorar cualitativamente el crecimiento de colonias de *S. aureus* y el efecto antibacteriano de bacteriófagos Fersisi, utilizando un medio de crecimiento de Brain Heart Infusion (BHI) con Agar 6%.

Se han evaluado el crecimiento de 3 placas conteniendo sólo *S. aureus* (control) o bien *S. aureus* más distintas cantidades de bacteriófagos. Los resultados que se muestran en la Figura 5.10.

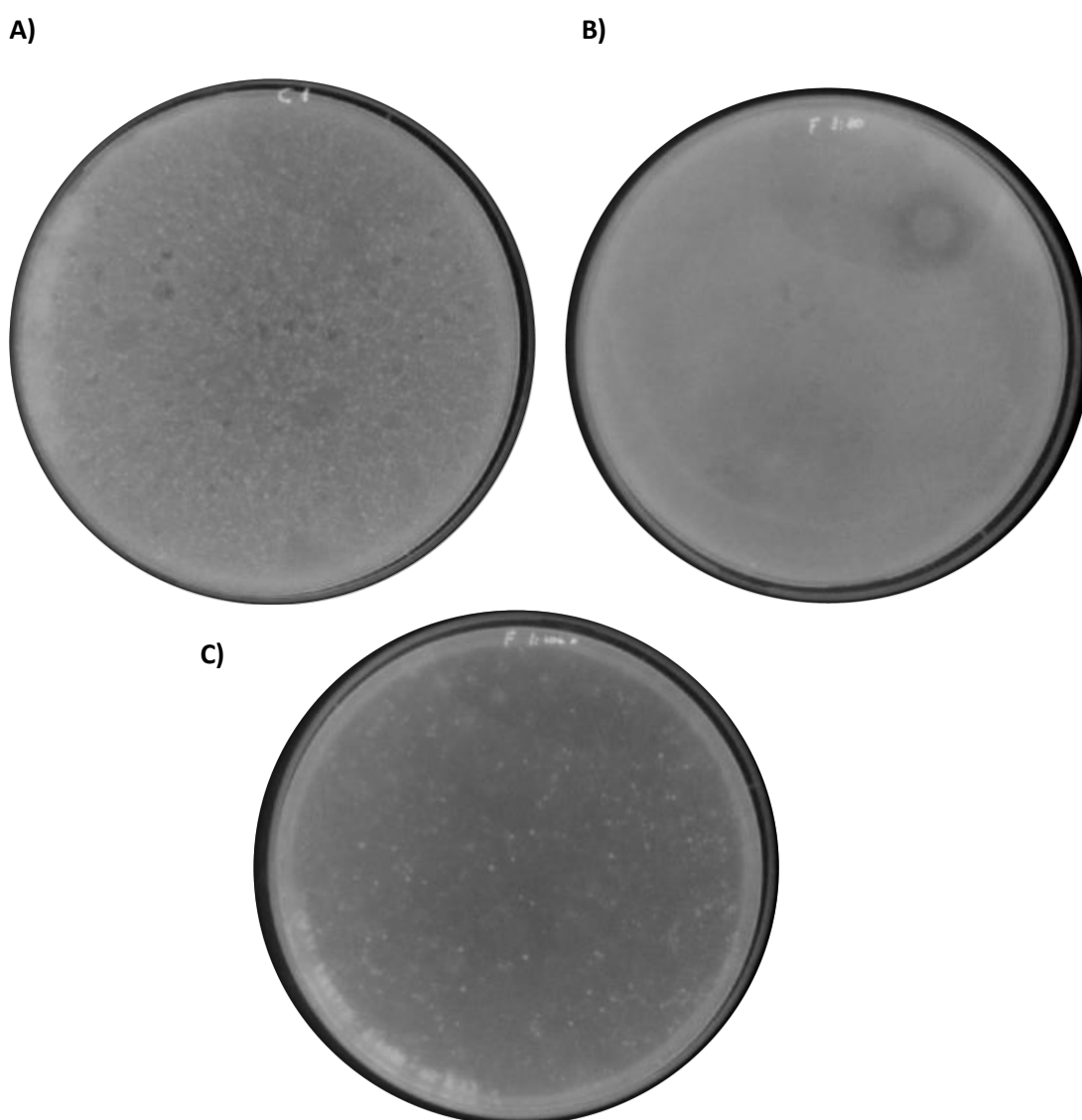


Figura 5.10. Imágenes de la inhibición bacteriana en placas de agar. **A)** Control con 10 mL cultivo *S. aureus*. **B)** *S. aureus* + Fersisi dilución 1:10. **C)** *S. aureus* + Fersisi dilución 1:1000.

La placa a) muestra el crecimiento de *S. aureus* sin ningún tipo de efecto antibacteriano, pudiéndose distinguir numerosas colonias alrededor de toda la superficie. Si se toma de referencia este control de crecimiento, se puede comprobar la inhibición bacteriana en las placas que contienen Fersisi, especialmente la muestra en la placa b) donde es posible comprobar los efectos de la lisis bacteriana al no distinguirse ninguna colonia en toda la superficie. Por otra parte, la dilución 1:1000 de Fersisi c) muestra que ha habido crecimiento bacteriano, aunque en menor medida que la placa de control a) ya que se observan diferentes calvas.

El ensayo con placas de agar ha resultado exitoso al mostrar cualitativamente la efectividad de los bacteriófagos de Fersisi.

5.4.2. Cultivos en placas de agar: Observación de halos

La observación de halos complementa los ensayos anteriores, siendo importante ya que demostrará la actividad antibacteriana de manera cualitativa de las matrices de PLA y PLA-PNH cargadas de bacteriófagos.

Matrices de PLA y PLA-PNH de 1 x 1 cm² cargadas con 100 µL/mg de bacteriófagos Fersisi, se depositarán en contacto con la superficie de la placa infectada con *S. aureus*. También se ha tomado como referencia matrices ausentes de bacteriófagos. Por otra parte, también se pretende evaluar el carácter antibacteriano de la PNH, añadiendo 5 µL de una disolución de 10 mg/mL de PNH sobre un punto de la superficie de la placa (*Figura 5.11*). Del mismo modo, se ha añadido 5 µL de Fersisi de dilución 1:2 en otra placa que nos servirá de como control positivo.

Analizando la *Figura 5.11*, las matrices, en las muestras cargadas de Fersisi, c) y d), es posible observar un halo translúcido alrededor de la matriz, demostrando la actividad antibacteriana a través de la placa de LB. Las matrices de PLA y PLA-PNH con ausencia de bacteriófagos no han presentado actividad antibacteriana.

En la muestra e) la PNH ha demostrado su actividad antibacteriana. Lo mismo sucedió con los 5 µL de Fersisi, que de nuevo, como en el anterior ensayo con placas de agar, ha demostrado su inhibición bacteriana al formar un halo sobre la placa.

Este ensayo ha sido un éxito, al lograr demostrar cualitativamente que las matrices de PLA y PLA-PNH son capaces de incorporar bacteriófagos entre sus microfibras manteniendo su actividad antibacteriana. Por otra parte, pese a que la PNH incorporada en las microfibras de PLA no ha mostrado ningún efecto, sí se ha comprobado la efectividad de la PNH como agente antibacteriano.

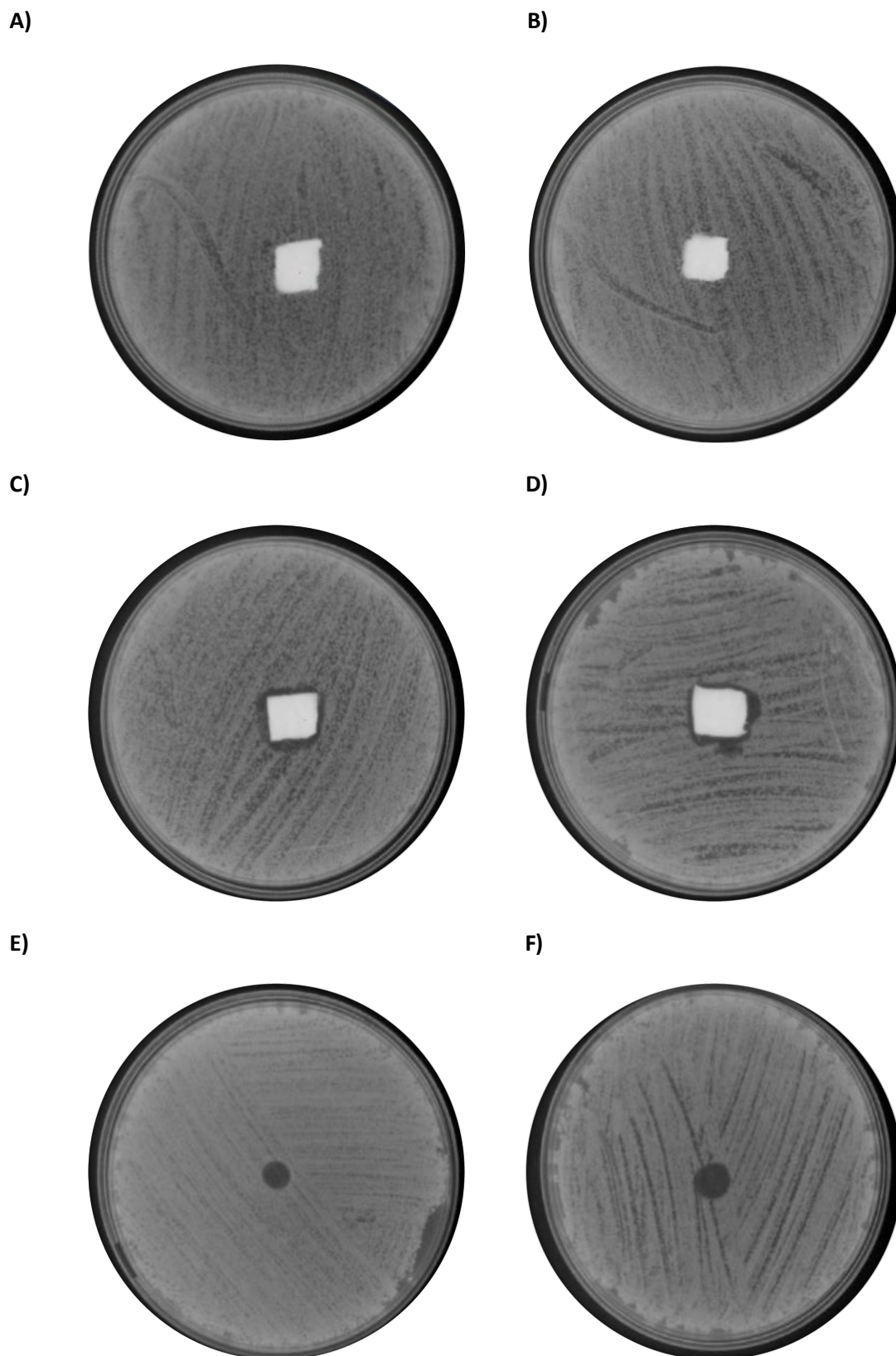


Figura 5.11. Imágenes de las placas de agar. a) Matriz de PLA. b) Matriz de PLA-PNH-2. c) Matriz de PLA con Fersisi. d) Matriz de PLA-PNH-2 con Fersisi e) PNH. f) Fersisi

5.4.3. Cultivos en medio líquido: Inhibición del crecimiento bacteriano

En este primer ensayo se evaluó el crecimiento bacteriano durante 316 horas de la bacteria *Staphylococcus aureus* en medio de cultivo LB broth, tomando medidas de la absorbancia a 595 nm de cada muestra de cultivo.

A partir de un volumen de LB de 250 mL con 50 μ L de *S. aureus* overnight (cultivo refrescado en 10 mL de LB durante 24h con 0,5 mL de un cultivo de *S. aureus* antiguo) se prepararon 16 muestras de 5 mL en diferentes tubos estériles, considerando cultivos de control las matrices que no contenían bacteriófagos. Las muestras del ensayo son clasificadas en la *Tabla 10*:

Tabla 10. Pesos de las matrices y volumen adsorbido de Fersisi.

| | Peso matriz (mg) | Volumen Fersis (μ l) |
|-----------|------------------|---------------------------|
| PLA-PNH-0 | 1,8 | 0 |
| | 4 | 0 |
| | 7,5 | 0 |
| | 4,2 | 0 |
| | 3,4 | 340 |
| | 6,4 | 640 |
| | 11,1 | 1110 |
| | 3,8 | 380 |
| PLA-PNH-2 | 3,1 | 0 |
| | 3,3 | 0 |
| | 3,1 | 0 |
| | 1,6 | 0 |
| | 5,6 | 560 |
| | 6,2 | 620 |
| | 3,9 | 390 |
| | 5,3 | 530 |

Con estos diferentes cultivos de muestras preparados será posible valorar todas las posibilidades de crecimiento que pueden afectar a la inhibición bacteriana.

Los cultivos de *S. aureus* con matrices de PLA-PNH-0 y PLA-PNH-2 son útiles como control de crecimiento, ya que representan el crecimiento máximo que puede alcanzar el cultivo bacteriano. Este crecimiento se calcula a partir de la *Ecuación 4*, donde el crecimiento máximo corresponde a la máxima absorbancia a 595 nm que ha sido detectada en el cultivo durante todo el período de crecimiento.

$$\text{Crecimiento relativo}(t) = \frac{Abs(t)}{Abs_{\text{crecimiento_máximo}}} \times 100$$

Ecuación 4. Crecimiento relativo del cultivo bacteriano calculado a partir de la absorbancia.

Los resultados de los controles de cultivo con bacteriófagos permiten valorar la eficacia de los bacteriófagos adsorbidos en las matrices de PLA-PNH-0 y PLA-PNH-2. En este caso, la cantidad de fagos añadidos para la adsorción en las matrices dependen del peso de la muestra. A partir de una dilución 1:2 de Fersisi, se añadieron 100 µL por mg de matriz. Por tanto las absorbancias han sido normalizadas por el peso de las matrices, siendo calculadas a partir de la *Ecuación 5*:

$$Abs_{mg}(t) = \frac{Abs_{S_aureus}(t) - Abs(0)}{mg \text{ Matriz}}$$

Ecuación 5. Absorbancia normalizada por peso de matriz, donde $Abs_{S_aureus}(t)$ representa la absorbancia en la placa en el tiempo t , $Abs(0)$ la absorbancia inicial y Abs_{placa} la absorbancia debida a la placa.

Considerando como referencia de máximo crecimiento el control de PLA-PNH-0 y PLA-PNH-2 sin bacteriófagos, se han obtenido los resultados mostrados en la *Figura 5.12*:

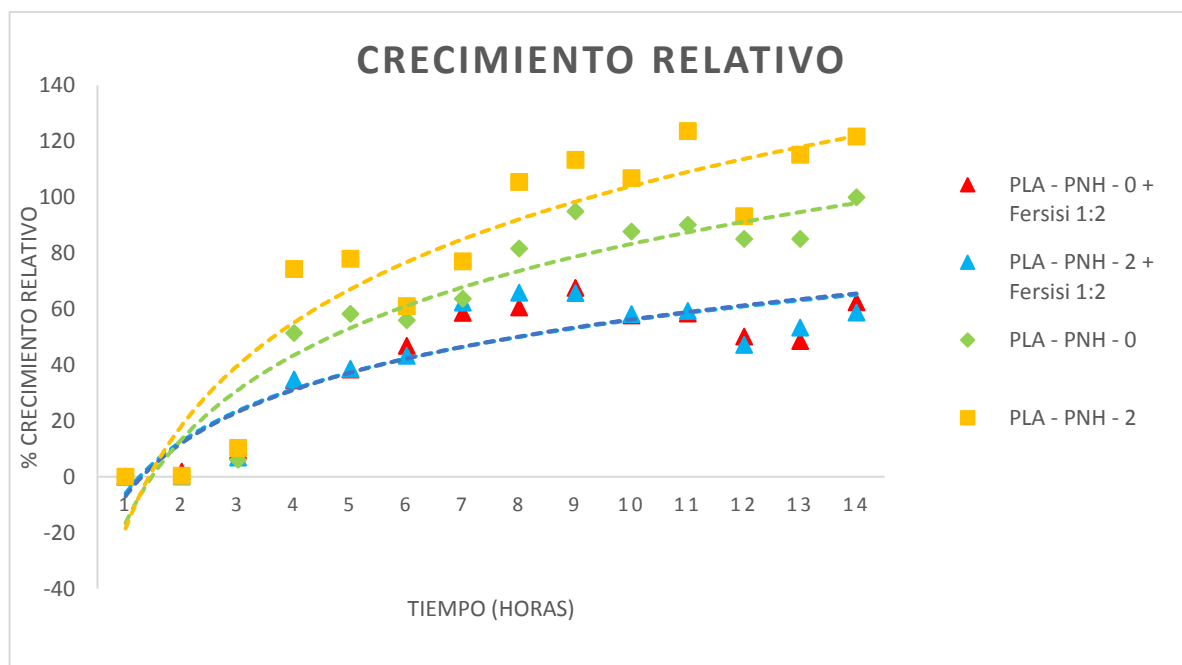


Figura 5.12. Crecimiento relativo del cultivo *S. aureus* con presencia de muestras de PLA/PLA-PNH con bacteriófagos de Fersisi adsorbidos en la matriz.

Los resultados (*Figura 5.12*) muestran un ajuste logarítmico del crecimiento relativo, donde se puede apreciar la tendencia de los cultivos con matrices cargadas de bacteriófagos (las líneas de crecimiento están solapadas), que presentan un crecimiento relativo inferior que los cultivos que contenían matrices sin bacteriófagos. La absorbancia máxima de los cultivos de PLA-PNH-0 sirve de referencia de control para calcular el crecimiento relativo (*Tabla 11*).

Tabla 11. Crecimiento relativo de los cultivos con bacteriófagos adsorbidos en muestras de PLA y PLA-PNH.

| Muestra | PLA-PNH-0 | PLA-PNH-2 | PLA-PNH-0 + Fersisi 1:2 | PLA-PNH-2 + Fersisi 1:2 |
|---------------------------------|-----------|-----------|-------------------------|-------------------------|
| Crecimiento relativo máximo (%) | 100 | 123,7 | 67,6 | 65,9 |

Con estos resultados (*Tabla 11*) es posible comprobar la efectividad de los bacteriófagos en las matrices. La inhibición bacteriana más efectiva se consiguió con bacteriófagos de Fersisi adsorbidos en matrices de PLA-PNH-2 al alcanzar un crecimiento máximo del 65,9%, un crecimiento algo inferior al del cultivo de PLA-PNH-0 con Fersisi (67,6%). Por otra parte, el cultivo de control de PLA-PNH-2 obtuvo un crecimiento relativo máximo de 123,7%, mostrando un crecimiento relativo superior al control de PLA-PNH-0.

De manera general, se puede observar que los crecimientos relativos en las matrices que contenían bacteriófagos son significativamente inferiores que las matrices que no contenían bacteriófagos adsorbidos, demostrando de manera cuantitativa que los bacteriófagos adsorbidos en las matrices de PLA-PNH-0 y PLA-PNH-2 lograron una inhibición del crecimiento antibacteriano.

6. Estudio de sostenibilidad

6.1. Impacto ambiental

Se ha efectuado un análisis del peligro que comportan algunas de las sustancias utilizadas durante la realización de este proyecto, siguiendo la normativa de la Unión Europea vigente. Dicha normativa está sujeta a las normas REACH que engloba el marco reglamentario de gestión de las sustancias químicas.

El Reglamento (CE) nº 1907/2006 (en adelante denominado REACH, acrónimo de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas) entró en vigor el 1 de junio de 2007 y tiene como objetivo principal mejorar la protección para la salud humana y el medio ambiente frente al riesgo que puede conllevar la fabricación, comercialización y uso de las sustancias y mezclas químicas.

En principio el REACH es de aplicación para todas las sustancias químicas presentes en la vida diaria ya sea como tales, en forma de mezclas o contenidas en artículos, siendo, por tanto, de aplicación en sectores económicos de índole diversa.

Para cumplir con las disposiciones del REACH las empresas deben identificar y gestionar los riesgos asociados a las sustancias que fabrican y comercializan en la Unión Europea. Deben demostrar cómo usar dichas sustancias de manera segura y comunicar toda aquella información relativa a las medidas de gestión de riesgos a las partes implicadas.

De acuerdo con este reglamento actual se presentan en la *Tabla 12* las sustancias utilizadas que son clasificadas como peligrosas y sus pictogramas y en la *Tabla 13* sus indicaciones (*Hazard Statements*) según el código establecido.

Tabla 12: Clasificación de las sustancias peligrosas utilizadas en el proyecto.

| Substancia química | Clase de peligro | Pictogramas |
|--------------------|--|--|
| Cloroformo | H302 + H332, H315, H319, H336, H351, H361d, H373 |   |
| Acetona | H225, H319, H336, EUH066 |   |
| Ácido Clorhídrico | H314, H335, H290 |   |
| Ácido Acético | H226, H314 |   |
| Acrilamida | H340, H350, H301, H317, H361f |   |

Tabla 13: Significado de los Hazard Statements de las sustancias de la tabla 12.

| Hazard Statements | Significado |
|-------------------|--|
| H225 | Es un líquido inflamable |
| H226 | Líquido y vapor inflamable |
| H290 | Puede ser corrosivo con los metales |
| H301 | Tóxico en caso de ingestión |
| H302 | Es nocivo en caso de ingestión |
| H314 | Provoca severas quemaduras y daño ocular |
| H315 | Provoca irritación cutánea |
| H317 | Puede provocar una reacción alérgica en la piel |
| H319 | Provoca irritación ocular grave |
| H332 | Es nocivo en caso de inhalación |
| H335 | Puede provocar irritación respiratoria |
| H336 | Puede provocar vértigo o somnolencia |
| H340 | Puede provocar defectos genéticos |
| H350 | Puede provocar cáncer |
| H351 | Se sospecha que provoca cáncer |
| H361 | Se sospecha que daña al feto |
| H373 | La exposición prolongada o repetida puede provocar daños en los órganos |
| EUHO66 | La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel |

Los residuos de PLA se han depositado en un recipiente para polímeros sólidos y las mezclas de disolventes (Cloroformo y acetona) en un recipiente para disolventes clorados dada la presencia del CHCl_3 .

Los residuos generados durante el estudio microbiológico, se han depositado en un contenedor especial destinado a material biopeligroso, tratándolo previamente con lejía al 10%.

6.2. Impacto social

La orientación de este proyecto de investigación está estrechamente ligada al beneficio social, más concretamente en el ámbito de la salud, ya que se intenta desarrollar un biomaterial para futuras aplicaciones biomédicas y/o farmacéuticas.

El objetivo de este PFC es el estudio y desarrollo de una matriz biodegradable cargada de bacteriófagos, que pueda servir de fármaco para el tratamiento de infecciones bacterianas, ofreciendo un camino alternativo al uso de antibióticos al poder combatir infecciones por bacterias múltiple droga resistentes (MDR).

7. Evaluación económica

En esta sección se lleva a cabo un estudio aproximado del coste económico del proyecto, teniendo en cuenta factores como el material, equipos y personal. Este estudio es importante y necesario para la toma de decisiones respecto la viabilidad del proyecto.

A continuación se muestran los costes de disolventes y productos químicos necesarios. Los precios de estos disolventes, así como de los productos químicos requeridos, se han obtenido de los catálogos de las empresas suministradoras, tales como Aldrich, Fluka, etc. Estos costes se recogen en la *Tabla 14*.

Tabla 14: Coste total de los productos utilizados

| Producto | Precio | Cantidad | Total (€) |
|-------------------------|-----------|----------|-----------|
| Acetona | 8,5 €/L | 0,5 L | 4,25 |
| Ácido acético | 28 €/L | 0,2 L | 5,6 |
| Cloroformo | 75 €/L | 1 L | 75 |
| Ácido clorhídrico | 15 €/L | 0,1 L | 1,5 |
| PLA | 7,5€/100g | 20 g | 1,5 |
| Protamina | 35,00 €/g | 0,15 g | 5,25 |
| Bacteriófagos (Fersisi) | 1400 €/L | 0,01 L | 14 |
| SUBTOTAL | | | 107,1 |
| Otros (+15%) | | | 16,06 |
| TOTAL | | | 123,17 |

El coste total de los productos utilizados es de 123,17 €.

A partir de la *Ecuación 6* y *Ecuación 7*, y considerado de amortización (i) de los equipos un interés del 3%, teniendo en cuenta una duración de la parte experimental del proyecto de 6 meses, se ha calculado el coste de los equipos utilizados durante el proyecto (*Tabla 15*).

$$Anualidad = Precio \times \frac{i \times (1 + i)^n}{(1 + i)^n - 1}$$

Ecuación 6. Tasa de anualidad.

$$Coste = \frac{Anualidad}{n^{\circ} usuarios} \times \frac{n^{\circ} meses}{12}$$

Ecuación 7. Coste del equipo.

Tabla 15: Coste total de los equipos utilizados.

| Equipo | Precio (€) | Tasa de amortización (años) | Nº personas | Anualidad (€/año) | Total (€) |
|----------------------|------------|-----------------------------|-------------|-------------------|-----------|
| Electrospinning | 20000 | 4 | 5 | 5380,54 | 538,05 |
| Espectrofotómetro IR | 24000 | 10 | 7 | 2813,53 | 200,96 |
| Espectrofotómetro UV | 16500 | 10 | 8 | 1934,30 | 120,89 |
| Lector ELISA | 3440 | 5 | 9 | 751,13 | 41,72 |
| Microscopio óptico | 12000 | 15 | 7 | 1005,19 | 71,79 |
| SEM | 210000 | 20 | 10 | 14115,29 | 705,76 |
| Electroforesis | 2500 | 6 | 7 | 461,49 | 32,96 |
| TOTAL | | | | | 1712,17 |

El coste total de los equipos utilizados es de 1712,17 €.

En la *Tabla 16* se puede ver el coste de personal teniendo en cuenta el total de horas dedicadas al proyecto:

Tabla 16: Coste total del personal.

| Función | Precio (€/h) | Tiempo (h) | Total (€) |
|--------------------------------|--------------|------------|-----------|
| Estudio precio y documentación | 20 | 100 | 2000 |
| Experimentación | 20 | 600 | 12000 |
| Análisis de resultados | 20 | 400 | 8000 |
| TOTAL | | | 22000 |

El coste total del personal ha sido de 22000 €.

Finalmente, se calcula el coste total del proyecto en la *Tabla 17*.

Tabla 17: Coste total del proyecto.

| Función | Total (€) |
|--|-----------|
| Coste productos | 123,17 |
| Coste equipos | 1712,17 |
| Coste personal | 22500,00 |
| Subtotal | 23835,34 |
| Gastos generales (10% subtotal) | 2383,53 |
| Coste operacional (21% subtotal, <i>Overhead</i>) | 5005,42 |
| Total | 31224,29 |

El coste total del proyecto ha sido de 31224,3 €.

Conclusiones

El objetivo principal de este PFC es el estudio de los bacteriófagos cargados en las microfibras de PLA/PNH. Las conclusiones extraídas del estudio son las siguientes:

- 1) Ha sido posible la incorporación de PNH en las disoluciones de PLA, a partir de una disolución de PNH en un medio de ácido clorhídrico y ácido acético.
- 2) La técnica de electrospinning ha permitido la obtención de microfibras de PLA-PNH.
- 3) La PNH disminuye el diámetro de las microfibras de PLA. Los resultados muestran que un mayor porcentaje de protamina conlleva la obtención de una fibra con diámetro menor.
- 4) La PNH disminuye significativamente la hidrofobicidad superficial de las matrices de PLA.
- 5) Ha sido posible demostrar la interacción electrostática de los bacteriófagos con la PNH mediante el estudio con electroforesis. Este hecho justifica la utilidad de la PNH en las matrices de PLA para la incorporación de bacteriófagos.
- 6) Los bacteriófagos pueden ser liberados por difusión desde las matrices de PLA-PNH, manteniendo su actividad lítica o antibacteriana. La inhibición del crecimiento bacteriano fue posible tras el estudio en medio líquido y placas de agar.
- 7) Los resultados indican que las matrices biodegradables de PLA-PNH cargadas con bacteriófagos tienen una aplicación potencial en el ámbito biomédico.

Agradecimientos

De antemano quisiera agradecer la implicación de mis tutores, Dr. Luis J. del Valle y Dra. Núria Saperas, por todo el tiempo que han podido dedicarme como por los conocimientos que me han transmitido para llevar a cabo este proyecto.

Por otra parte también quisiera agradecer al Dr. Jordi Puiggalí, el darme la oportunidad de realizar mi PFC en el grupo de investigación de PSEP y por su interés mostrado durante la evolución del proyecto. Asimismo a todos los miembros del Grupo de Investigación en Polímeros Sintéticos, Estructura y Propiedades (PSEP) del Departamento de Ingeniería Química de la Universitat Politècnica de Catalunya, que siempre estuvieron disponibles para ofrecerme ayuda.

Especialmente quisiera dar las gracias a mi pareja Alba Cantero, una persona que ha estado presente los 5 años de mi vida universitaria, apoyándome incondicionalmente en todo momento y trasmitiéndome fuerza y positivismo cuando lo he necesitado. Sin ella no habría sido lo mismo.

Por último, y no por ello menos importante, dar las gracias a toda mi familia por haberme servido de gran apoyo, por los grandes consejos, por la comprensión y ánimos que me han dado durante todos estos años. Sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.

Bibliografía

1. PUIGGALÍ J. *Polímeros*. TQA. EEBE: 2016.
2. OVIEDO, U. DE. Introducción a los polímeros. A: [en línea]. [Consulta: 20 julio 2017]. Disponible a: <http://www6.uniovi.es/usr/fblanco/AP.T1.1-MPyC.Tema1.IntroduccionPolimeros.Generalidades.pdf>.
3. ALICANTE, U. DE. Estructura y propiedades de los polímeros. A: [en línea]. [Consulta: 20 julio 2017]. Disponible a: <http://iq.ua.es/TPO/Tema1.pdf>.
4. CATIA BASTIOLI. *Handbook of Biodegradable Polymers*. A: . 2005, Vol. 2nd Editio.
5. CHANDRA, R., RUSTGI, R. *Biodegradable polymers. Progress in Polymer Science*. Pergamon. 1998.
6. SERNA, L., RODRIGUEZ, A., A. *Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones*. Ingeniería. 2003.
7. REN, J. *Biodegradable Poly(Lactic Acid). Synthesis, modification, processing and applications*. Springer. 2010.
8. LOPEZ, M., RODRIGUEZ, L., D.S. Electrospinning: la era de las nanofibras. A: [en línea]. 2013. [Consulta: 23 julio 2017]. Disponible a: <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/ENE13/duque.pdf>.
9. SEERAM, R., KAZUTOSHI, F., WEE-EONG, T., TEIK-CHENG, L., ZUWEI, M. *An introduction to electrospinning and nanofibers, the Electrospinning process*. Singapur: 2005.
10. ALEXANDER SULAKVELIDZE, ZEMPHIRA ALAVIDZE, J. GLEEN MORRIS, J.. Bacteriophage Therapy. A: *Antimicrobial Agents Chemotherapy* [en línea]. 2001, Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90351/>.
11. SHORS, T. *Understanding viruses*. University of Wisconsin-Oshkosh: 2008.
12. CALENDAR, R. *The Bacteriophages*. Springer. University of California: 1988.
13. H. ANANY, W. CHEN, R.P.A.M.W.G. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes. A: *American Society for Microbiology* [en línea]. 2011, Disponible a: <http://aem.asm.org/content/77/18/6379.full>.
14. Leicester, U. of. Bacteriophage. A: [en línea]. [Consulta: 28 julio 2017]. Disponible a: <http://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/microbial-genetics-1/bacteriophage>.
15. K. MARKOISHVILI, G. TSITLANADZE, R. KATSARAVA, J. G. MORRIS, JR., A.A.S. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. A: *International Journal of Dermatology*. 2002, p. 41, 453-458.
16. JIKIA, N. CHKHAIDZE, E. IMEDASHVILI, I. MGALOBILISHVILI, G. TSITLANADZE, R. KATSARAVA, G. MORRIS, A.S. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. A: *Clinical and Experimental Dermatology* [en línea]. 2001, p. 30, 23-26. Disponible a:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278644/>.

17. HEATHER A. PEARSON, GYAN S. SAHUKHAL, M.O.E.A.M.W.U. Phage-Bacterium War on Polymeric Surfaces: Can Surface- Anchored Bacteriophages Eliminate Microbial Infections? A: *Biomacromolecules*. 2013, p. 14, 1257-1261.

18. CALIFORNA, U.O. Novel Phage Therapy Saves Patient with Multidrug-Resistant Bacterial Infection. A: [en línia]. 2017, Disponible a: <https://health.ucsd.edu/news/releases/Pages/2017-04-25-novel-phage-therapy-saves-patient-with-multidrug-resistant-bacterial-infection.aspx>.

19. VILLAREAL, A. Así metí un virus soviético ilegalmente en España para salvar la vida de mi padr. A: *El Confidencial* [en línia]. 2017, Disponible a: https://www.elconfidencial.com/tecnologia/ciencia/2017-09-16/virus-sovietico-salvar-vida-padre_1444373/?utm_source=facebook&utm_medium=social&utm_campaign=ECFDManual.

20. ROD BALHORN. The protamine family of sperm nuclear proteins. A: *Genome biology* [en línia]. 2007, Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2375014/>.

21. GONZÁLEZ, J.V. *Nuevos nanosistemas a base de protamina para la liberación de antígenos* [en línia]. Universidad de Santiago de Compostela, 2013. Disponible a: https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/10007/rep_613.pdf?sequence=1.

22. I. LOZANO, P. AVANZAS, C.M. Anticoagulación durante el intervencionismo coronario. A: *Hospital Universitario Central de Asturias* [en línia]. 2006, Disponible a: <http://www.revespcardiol.org/es/anticoagulacion-durante-el-intervencionismo-coronario/articulo/13096228/>.

23. ORGANIZATION, W.I.P. Method for the production of protamine. A: [en línia]. 2000, Disponible a: https://patentscope.wipo.int/search/docservicepdf_pct/id00000000109874/PAMPH/WO2003106485.pdf.

24. G. BERTANI. Studies on Lysogenesis. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia coli. A: *Journal of Bacteriology* [en línia]. 1951, Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386127/pdf/jbacter00613-0069.pdf>.

25. SEKIMIZU, C.K.A.K. Colony Spreading in Staphylococcus aureus. A: [en línia]. 2006, Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1899384/>.